

UCH-FC
MAG-BMCN
M491
C.3



Facultad de Ciencias
Universidad de Chile
Escuela de Postgrado

“Alteraciones en la distribución de actina y proteínas asociadas a su nucleación en células acinares y cambios en la distribución de las células mioepiteliales de glándulas salivales labiales en pacientes con el Síndrome de Sjögren”

Tesis
Entregada a la
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y
Neurociencias

Facultad De Ciencias
Universidad de Chile



Por

DANIEL ALEJANDRO MEDINA SALAS

Junio 2011

Director de Tesis Dr:

Juan Fernández H.

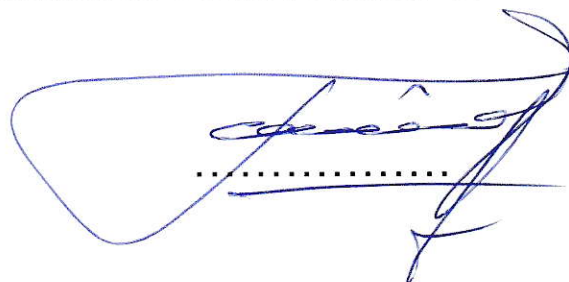
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato.

DANIEL ALEJANDRO MEDINA SALAS

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 20 de Mayo de 2011.

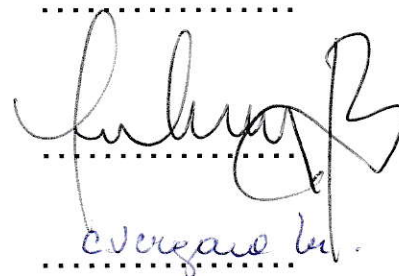
Director de Tesis:
Dr. Juan Fernández H.



Co-Director de Tesis
Dr. Sergio Aguilera

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Christian Gonzáles B.



Dra. Cecilia Vergara M.

BIOGRAFÍA



Nací un 12 de Septiembre de 1980 en Santiago. Cursé mis sus estudios de enseñanza media en el Colegio Nuestra Señora de Guadalupe hasta el año 1998. El año 1999 entré a estudiar Bachillerato en la Universidad de Chile, obteniendo la mención en Ciencias en el año 2001, año en el cual comencé la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias, realizando mi tesis de grado en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada de la Universidad de Santiago con el Dr. Claudio Martínez. El año 2009 entré a cursar el Magíster en Ciencias Biológicas, oportunidad en la cual trabajé en el Laboratorio de Biología Celular del Desarrollo de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, con el objetivo de estudiar la organización del citoesqueleto en las células acinares de pacientes con el Síndrome de Sjögren. Durante el mismo año, enseñé Artes Marciales en la Facultad de Ciencias. Durante el 2010 comencé una Beca en la Universitat de Valencia, España, relacionada con la regulación génica a nivel transcripcional en levaduras. Espero algún día aportar a nuestro país con todos mis estudios.

"En ciencia los avances se producen gracias a nuevas técnicas, nuevos resultados y nuevas ideas, probablemente en este orden".

Sidney Brenner.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue posible gracias al aporte de varias personas, en especial del Dr. Juan Fernández, quién constantemente entregó su consejo para la realización y análisis de cada uno de los experimentos. Más allá de esos hechos puntuales, el Dr. Juan Fernández fue quién me alentó a continuar el programa de Magíster de la Facultad, por lo cual estoy profundamente agradecido, gesto que me permitió continuar mi preparación profesional. Esta tesis no hubiera sido posible sin el aporte constante del Dr. Sergio Aguilera, quién consiguió y entregó gran parte del financiamiento necesario para el estudio, además de aportar las muestras y datos de cada paciente. Agradezco además, a la Clínica Indisa por facilitar el lugar para la toma de muestras y al equipo de profesionales a cargo de dicha tarea.

Quiero también agradecer el aporte de los compañeros de laboratorio al desarrollo del estudio, a Ricardo Fuentes por su apoyo en la parte de microscopía de fluorescencia y a Victoria Sarno por su ayuda en la toma de muestras y su trabajo en la microscopía electrónica. A Luis, Felipe, Miguel y Francisco, por hacer la estancia en el laboratorio más agradable. A Víctor Guzmán por su apoyo técnico y su buena disposición. A la escuela de postgrado, en especial a la Srta. Janet Guzmán por sus gestiones para el término de esta tesis.

Finalmente quiero agradecer a mí familia por su apoyo incondicional en mis proyectos, a mi Padre, Madre, y en especial a Carlos, Cristian y a Mauricio.

ÍNDICE DE MATERIAS

| | Página |
|--|--------|
| Portada | i |
| Biografía | iii |
| Agradecimientos | iv |
| Índice de Materias | v |
| Índice de Figuras | vi |
| Índice de Tablas | vii |
| Resumen | viii |
| Introducción | 1 |
| Hipótesis | 12 |
| Objetivos | 13 |
| Materiales y Métodos | 14 |
| Pacientes y obtención de muestras | 14 |
| Inmunofluorescencia | 15 |
| Recuento de Acinos según la localización de la actina | 19 |
| Tinción con Hematoxilina/Eosina | 20 |
| Microscopía electrónica | 20 |
| Resultados | 23 |
| Estructura de los acinos de las glándulas salivales labiales | 23 |
| Estructura de las glándulas salivales labiales | 24 |
| Organización del citoesqueleto de actina | 25 |
| Recuento del número de acinos | 28 |
| Localización de proteínas del citoesqueleto y asociadas a actina | 34 |
| Organización de las células mioepiteliales | 38 |
| Discusión | 42 |
| Conclusiones | 49 |
| Bibliografía | 50 |
| Apéndice: Soluciones utilizadas para Inmunofluorescencia | 55 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1 Acinos de las glándulas salivales y sistema ductal | 6 |
| Figura 2 Modelo de secreción salival | 8 |
| Figura 3 Organización del citoesqueleto en una célula acinar | 10 |
| Figura 4 Acinos coloreados con la tinción de Hematoxilina/Eosina | 23 |
| Figura 5 Tinción de Hematoxilina/Eosina | 24 |
| Figura 6 Organización del citoesqueleto de actina en acinos | 26 |
| Figura 7 Distribución de la actina en acinos | 27 |
| Figura 8 Microfotografía electrónica de acinos alterados | 28 |
| Figura 9 Cuociente entre el número de acinos normales y alterados | 30 |
| Figura 10 Recuento del número de acinos | 32 |
| Figura 11 Número promedio de acinos por área de estudio | 33 |
| Figura 12 Distribución de proteínas relacionadas a actina | 35 |
| Figura 13 Organización de los microtúbulos y de la citoqueratina 18 | 37 |
| Figura 14 Distribución de células mioepiteliales | 39 |
| Figura 15 Número promedio de perfiles de células mioepiteliales | 41 |
| Figura 16 Representación de una célula acinar | 48 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1 Listado de pacientes analizados | 17 |
| Tabla 2 Anticuerpos y sondas utilizadas para inmunofluorescencia | 21 |
| Tabla 3 Clasificación de los acinos según la distribución de la actina | 22 |
| Tabla 4 Datos promedios para cada grupo de estudio | 29 |
| Tabla 6 Valores de p obtenidos a través del test de ANOVA | 33 |
| Tabla 7 Test de ANOVA para el número de células mioepiteliales | 41 |

RESUMEN

El Síndrome de Sjögren (SS) es una exocrinopatología inflamatoria autoinmune, de etiología desconocida, caracterizada por el deterioro de las glándulas salivales y lacrimales que causa *xerostomía* (sequedad bucal) y/o *keratoconjunctivitis sicca* (sequedad ocular). Algunos autores indican que la prevalencia del SS varía entre el 1 al 3% de la población mundial. Los factores etiológicos del SS son desconocidos, pero se postula que factores ambientales gatillarían procesos inflamatorios en individuos que poseen predisposición genética a desarrollar la enfermedad, mediante la presentación de auto-antígenos a los linfocitos, los cuales iniciarían la respuesta autoinmune.

Puede presentarse solo (SS primario), o en compañía de otras enfermedades autoinmunes (SS secundario), tales como artritis reumatoidea. Su manifestación puede ocurrir a cualquier edad, diagnosticándose mayoritariamente en mujeres de entre 40 y 50 años, en una relación de 9:1 con respecto a hombres. La predominancia de la enfermedad en mujeres parece relacionarse con las alteraciones hormonales que ocurren alrededor de la menopausia.

Las unidades secretoras de las glándulas salivales, conocidas como acinos, están formadas por células secretoras altamente polarizadas, que poseen una región basal, donde se encuentran la maquinaria productora de la secreción salival y una región apical, por donde se descarga la secreción hacia una cavidad central, o lumen, conectada a un sistema de conductos que transporta la secreción salival hasta la cavidad bucal. Asociadas a la región

SUMMARY

Sjögren's Syndrome (SS) is an autoimmune inflammatory exocrinopathy of unknown etiology, characterized by commitment and deterioration of the salivary and lacrimal glands, mainly causing *xerostomy* (dry mouth) and/or *keratoconjunctivitis sicca* (dry eye). Some authors suggest that the prevalence of SS varies from 1 to 3% of world population. The etiologic factors of SS are unknown, but is postulated that environmental factors would trigger inflammation in individuals who have genetic predisposition to the disease through auto-antigen presentation to lymphocytes, triggering the autoimmune response.

It may occur alone (primary SS) or in the company of other autoimmune diseases (secondary SS) such as rheumatoid arthritis. Your manifestation can occur at any age, mostly diagnosed in women between 40 and 50 years, in a 9:1 ratio to men. The prevalence of the disease in women appears to be associated with hormonal changes that occur around menopause.

The secretory units of salivary glands, known as acini, are formed by highly polarized secretory cells, which have a basal region, where the cell are producing saliva secretion and an apical region, where the secretion is discharged into a central cavity, called lumen, connected to a duct system that carries the salivary secretion to the oral cavity. Associated with the basal region of acini are located a star-shaped cell type called myoepithelial cells, whose function is believed to be related to the mobilization of the secretion from the

acini to the duct system, probably by increasing the pressure on these by movements of contraction.

In patients with SS, the deterioration of the salivary glands may affect cellular processes related with the transport and secretion of saliva, affecting the normal operation. Reported alterations in the morphology of the apical region of acinar cell including loss of microvilli, increased lumen size, fusion and accumulation of secretory granules, suggest the occurrence of changes at the cytoskeleton.

In this study, we observed a disruption of the three components of the cytoskeleton, especially in actin filaments, which are redistributed to the basal region of acinar cells, together with other proteins involved in cell dynamics of actin. On the other hand, we have studied the organization of myoepithelial cells in relation to acinar cells.

INTRODUCCIÓN

Generalidades del SS

El Síndrome de Sjögren (SS) es una exocrinopatología inflamatoria autoinmune (49), de etiología desconocida, caracterizado principalmente por la disfunción y destrucción del parénquima de las glándulas salivales y lacrimales (22), acompañada de infiltración linfocitaria focal progresiva, junto a la producción de citoquinas y autoanticuerpos característicos de la enfermedad (2, 23).

Entre sus manifestaciones, se destacan la *xerostomía* (sequedad bucal) y la *keratoconjunctivitis sicca* (sequedad ocular) (51). Los pacientes afectados por el SS tienen dificultades para tragar alimentos secos, para hablar continuamente, sienten ardor bucal, pérdida del gusto y olfato. Además, desarrollan caries dentales atípicas y presentan molestias oculares por la falta de secreción lagrimal (49). Puede manifestarse a cualquier edad, diagnosticándose mayoritariamente en mujeres de entre 40 y 50 años, en una relación de 9:1 con respecto a hombres (2). La predominancia del síndrome en mujeres parece estar relacionada con las alteraciones hormonales que ocurren alrededor de la menopausia (25, 53). El SS puede presentarse solo (SS primario), o en compañía de otras enfermedades autoinmunes (SS secundario),

tales como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoidea o tiroiditis de Hashimoto, siendo estas dos últimas las más frecuentes (51).

Para diagnosticar el SS es necesario realizar una evaluación del compromiso glandular, midiendo la cantidad y calidad de la secreción salival y/o ocular. Además, se debe estudiar la histología de la glándula y determinar la presencia de autoanticuerpos en la sangre de los pacientes (1). Dependiendo del criterio de diagnóstico y de la población analizada, algunos autores indican que la prevalencia del SS varía entre el 1 y el 3% (4), mientras que la prevalencia del SS primario varía entre el 0,5 y el 2,7% de la población (2). Actualmente, el criterio de diagnóstico más utilizado para el SS es el criterio Europeo/Americano, que se basa en: (a) establecer la existencia de sequedad oral y ocular (b) determinar la presencia de autoanticuerpos y (c) evaluar la frecuencia de infiltrados linfocitarios focales en las glándulas salivales (7).

Etiología del SS

Los factores etiológicos del SS son desconocidos, pero se postula que factores ambientales iniciarían procesos inflamatorios en individuos que poseen predisposición genética a desarrollar la enfermedad (18). Estos factores inducirían la expresión de antígenos en las células afectadas, los que serían reconocidos por los linfocitos circulantes, activando la respuesta inmune (1). Algunos virus, cuya presencia ha sido relacionada con el SS, podrían ser potenciales agentes inductores y perpetuadores de la respuesta inmune, entre ellos, el virus de Epstein-Barr (EBV), de la hepatitis C (HCV), de la

inmunodeficiencia humana (HIV) y de la leucemia T humana (HTLV-1), (1, 18, 53). El progresivo infiltrado linfocitario que afecta a las glándulas se compone de aproximadamente un 20% de linfocitos B y un 80% de linfocitos T (49). De estos últimos, un 80% poseen el marcador de activación linfocitaria CD45RO, lo cual sugiere que estos linfocitos T activados juegan un papel clave en la progresión de la enfermedad mediante la activación de los linfocitos B. Estos serían los responsables de la producción de los autoanticuerpos característicos de la enfermedad (1, 48).

Diversos mecanismos se han propuesto para explicar la respuesta autoinmune desarrollada en los pacientes afectados del SS. La molécula ICAM-1 (CDC54), corresponde a una proteína de superficie expresada por diversas células epiteliales no hematopoiéticas, que participa en la activación de las células T mediante adhesión celular y coestimulación. En pacientes con el SS se ha identificado un incremento en la expresión de ICAM-1, lo cual sugiere que esta molécula podría participar en la inducción y el mantenimiento del infiltrado linfocitario (23). Otras moléculas de adhesión involucradas en el reclutamiento linfocitario, tales como VCAM-1 y ELAM-1, posiblemente también participen en el establecimiento del infiltrado linfocitario. VCAM-1 es expresada en vénulas postcapilares y su ligando linfocitario corresponde a la molécula VLA-4. En pacientes con el SS se ha detectado una alta expresión de VCAM-1, mientras que el infiltrado linfocitario resulta positivo para VLA-4 y LFA-1, este último corresponde al ligando de ICAM-1. Estos antecedentes sugieren que los linfocitos positivos para VLA-4 y LFA-1 serían incorporados en las glándulas a

través de VCAM-1 e ICAM-1, expresados por el endotelio de las glándulas salivales en respuesta a citoquinas inflamatorias como IL-1 β e IFN- γ (1).

Durante el desarrollo del infiltrado linfocitario, los linfocitos B se ubican preferentemente en la cercanía de los conductos, mientras que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se ubican cercanos a los linfocitos B (1). En biopsias de glándulas salivales de pacientes con el SS se ha detectado un aumento de 40 veces en el nivel de mRNA y de las citoquinas IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-10, IFN γ y TNF α . Los linfocitos T CD4 serían los responsables del aumento en la secreción de IFN γ , IL-2 e IL-10, mientras que las células epiteliales producirían IL-1 α , IL-6 y TNF α , participando de manera activa en la patogénesis de la enfermedad (14). Una citoquina de interés en este contexto, es el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α), que estimularía los procesos inflamatorios mediante la activación local del endotelio por liberación de óxido nítrico. Este produciría vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Esta cadena de sucesos estimularía el reclutamiento de células inflamatorias, que provocarían la activación de los linfocitos T y B. En pacientes con el SS se ha reportado un aumento de TNF- α y de sus receptores CD120a y CD120b, lo cual sugiere que TNF- α sería un factor importante en los procesos inflamatorios experimentados por las glándulas durante el desarrollo de la enfermedad.

Glándulas salivales

Las glándulas salivales producen la saliva, que es una mezcla compleja de proteínas, agua y electrolitos. Las glándulas consisten de 2 clases de tejidos: (a) un parénquima, que es responsable de la secreción y (b) un estroma, que da soporte al parénquima. Hay glándulas salivales mayores y menores, éstas últimas, se distribuyen por debajo de gran parte de la mucosa oral. Las unidades secretoras salivales, llamadas acinos, están compuestas por células secretoras altamente polarizadas que descargan su secreción hacia una cavidad central que se conecta a un sistema de conductos, responsable del transporte de la secreción salival hacia la cavidad bucal. Existen 3 tipos de acinos: mucosos, serosos y mixtos. Los acinos mucosos son voluminosos y producen mayoritariamente mucinas, mientras que los acinos serosos son de menor tamaño y producen proteínas, como la amilasa salival (1). La mayoría de las glándulas salivales menores poseen mezclas de acinos, con franco predominio de los mucosos.

Asociadas a la región basal de los acinos se ubican las células mioepiteliales, cuya función parece relacionarse con la movilización de la secreción desde los acinos hacia el sistema de conductos, mediante movimientos de contracción. Algunos marcadores utilizados para su identificación son la citoqueratina 14, calponina, vimentina y α -SMA (33).

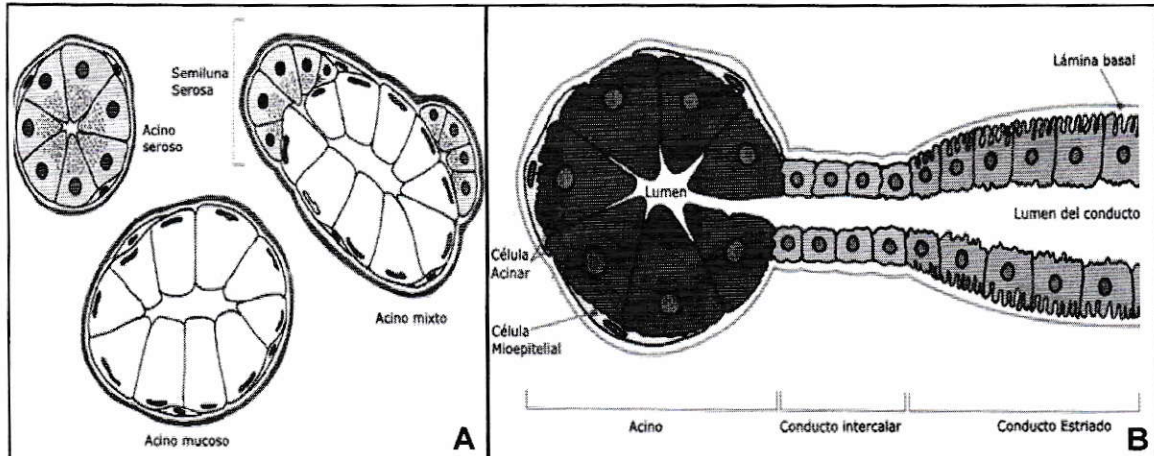


Figura 1. Acinos de las glándulas salivales y sistema ductal. En (A) se muestran los 3 tipos de acinos encontrados en una glándula salival. En (B) se esquematiza el sistema de conductos en relación a un acino. Nótese en (B) la asociación de células mioepiteliales con la periferia del acino (Modificado de ref. 54).

Modelos de hiposecreción glandular en el Síndrome de Sjögren

Algunos de los estudios realizados en pacientes con el SS han relacionado la disminución de la función glandular con la pérdida de tejido acinar, presumiblemente asociada a la reacción autoinmune. Algunos investigadores sostienen que la hiposecreción se debería a la pérdida de células secretoras (8). Esta conclusión corresponde al *modelo clásico de hiposecreción glandular*, en el cual la etiopatogénesis del Síndrome de Sjögren se debería a una reacción iniciada por antígenos de agentes infecciosos, cuya respuesta inmune produciría una reacción cruzada con los antígenos propios del tejido epitelial. Esto desencadenaría procesos apoptóticos (29, 38) relacionados a: 1.- liberación de proteasas como perforina y granzima-B por los linfocitos T citotóxicos, 2.- interacción del ligando Fas de los linfocitos T con el antígeno Fas

(Apo-1/CD95) expresado por las células alteradas, o por una sub-regulación del inhibidor apoptótico Bcl-2 y la sobre-expresión del inductor apoptótico Bax. Estos eventos provocarían un extensivo daño del tejido glandular, cuya consecuencia sería la disminución de la función secretora (29). Pero el *modelo clásico de hiposecreción glandular* no ha sido del todo aceptado. Algunos pacientes con el SS, presentan señales de xerostomía antes de sufrir una destrucción importante del parénquima glandular (9), mientras que otros han recuperado parte de la secreción salival mediante medicamentos (40). Además, recientemente se ha informado que los eventos apoptóticos en las células epiteliales de las glándulas salivales ocurren con baja frecuencia (34). En base a este tipo de observaciones, se ha propuesto un *modelo no apoptótico de hiposecreción glandular*, en el cual, la atrofia glandular y la pérdida del tejido epitelial serían una consecuencia y no la causa inicial de la hiposecreción glandular, la que sería causada por la acción del sistema inmune sobre las glándulas salivales (8).

Para entender el *modelo no apoptótico de hiposecreción glandular* es necesario comprender cómo se lleva a cabo el proceso de secreción en las células acinares. El proceso comienza con la unión de la acetilcolina a los receptores muscarínicos en la superficie de las células acinares. La activación de estos receptores estimularía la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), el cual difunde en el citoplasma y se une a su receptor (IP₃R) en el retículo endoplasmático, estimulando la liberación de calcio hacia el citosol. El aumento de la concentración de calcio libre abre canales de Cl⁻, en la región apical de la

célula, permitiendo su difusión hacia el lumen acinar en compañía de Na^+ . El gradiente osmótico generado por la salida de estos 2 electrolitos arrastra el agua hacia el lumen acinar. De acuerdo a esto, el sistema inmune podría afectar el proceso de secreción alterando cualquiera de las etapas previas a la secreción (8).

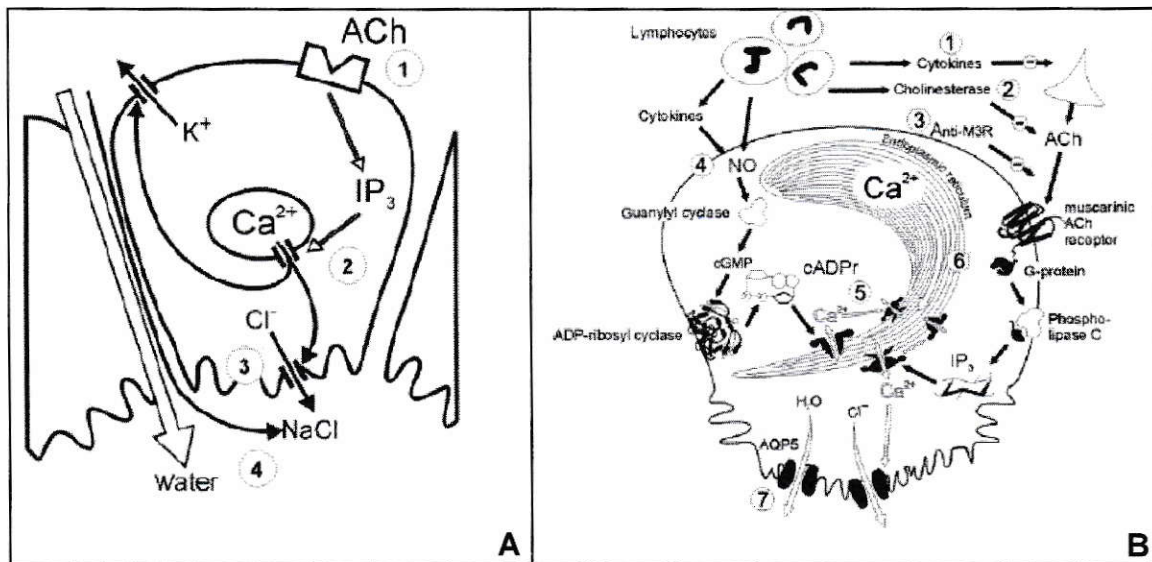


Figura 2. Modelo de secreción salival y modelo no apoptótico de hiposecreción glandular. En (A) se muestra cómo la Acetil Colina se une a los receptores muscarínicos (1) estimulando la producción de IP_3 (2), provocando la liberación de calcio al citoplasma, lo cual abre los canales de Cl^- en la región apical, permitiendo la salida de NaCl (3) y la consecuente salida de agua debido al gradiente de potencial osmótico generado (4). En (B) se muestran las etapas en las que el sistema inmune podría afectar la secreción según el modelo no apoptótico de hiposecreción. 1) Liberación de neurotransmisores por citoquinas, 2) aumento en la degradación de acetilcolina por incremento de las colinesterasas, 3) bloqueo del receptor muscarínico por auto-anticuerpos, 4) alteraciones en los niveles de NO, 5) cambios en los niveles intracelulares de calcio, 6) transporte alterado de calcio y 7) expresión alterada de aquaporinas. (Modificado de Dawson, 2006).

Citoesqueleto

El citoesqueleto es un componente celular involucrado en diversas tareas celulares, que van desde el soporte mecánico hasta el control de la dinámica y transporte intracelular. Está compuesto de microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos. Los microfilamentos, conocidos también como filamentos de actina, poseen un diámetro de 5 a 9 nm y están formados por polímeros de actina. La dinámica de los microfilamento es regulada por proteínas asociadas a actina, tales como profilina, wasp, cofilina, arp2/3, etc., y por vías de señalización mediadas por GTPasas que responden a estímulos extra e intracelulares. Los microfilamentos están envueltos en múltiples tareas, tales como motilidad celular, endo/exocitosis, establecimiento de la polaridad celular, mantención de la forma celular, transporte intracelular y organización de la región apical de células polarizadas (16). La miosina II es un motor molecular cuya función está asociada a los microfilamentos. Participa de la contracción muscular y citoquinesis. En las células no musculares la miosina II genera tensión entre los microfilamentos paralelos durante procesos de movimiento celular y transporte.

Los filamentos intermedios poseen un diámetro cercano a los 10 nm y están formados por proteínas codificadas por una de las familias génicas más grandes en humanos, con alrededor de 65 genes funcionales. Son particularmente abundantes en el citoplasma de células sometidas a estrés mecánico y su función principal consiste en proporcionar resistencia física. Cada tipo celular expresa familias distintas de filamentos intermedios. Según el

tipo de célula epitelial, es posible encontrar alrededor de 20 tipos distintos de proteínas pertenecientes a la familia de las queratinas (28).

Los microtúbulos son estructuras cilíndricas de 25 nm de diámetro, formadas por protofilamentos paralelos, cada uno compuesto por subunidades alternadas de α y β -tubulina. Esta disposición le confiere a los microtúbulos propiedades mucho más rígidas que las que poseen los microfilamentos. La función de los microtúbulos está relacionada con la organización citoplasmática, la división celular y el transporte intracelular (11).

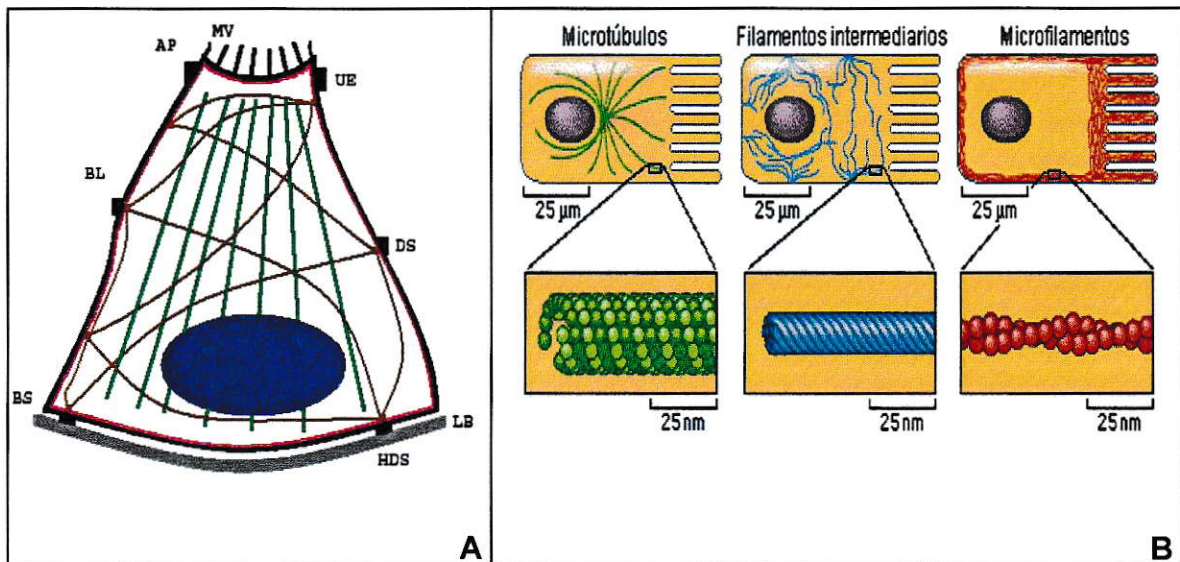


Figura 3. Organización del citoesqueleto en una célula acinar. La figura (A) representa el citoesqueleto de una célula acinar normal. En rojo se muestran los microfilamentos, que se distribuyen bajo la membrana citoplasmática (en negro), mientras que los filamentos intermedios (en café), se distribuyen a través del interior celular. Los microtúbulos (representados por líneas verdes) se orientan desde la región apical (AP), hacia la región basal de la célula (BS). El núcleo, en azul, se localiza en el tercio basal de la célula. El esquema muestra además la localización de las microvellosidades (MV), uniones estrechas (UE), desmosomas (DS), hemidesmosomas (HDS), lámina basal (LB, en gris) y la región basolateral (BL) (modificado de referencia 1). La figura (B) muestra la disposición y el tamaño del citoesqueleto en una célula epitelial (modificada de ref. 55).

Debido a que el SS es una enfermedad de carácter autoinmune, gran parte de los estudios realizados apuntan principalmente a la progresión a nivel inmunológico de la enfermedad, explicando el daño del parénquima glandular y la hiposecreción como una consecuencia de la presencia de un infiltrado linfocitario (38). En los últimos años, los estudios se han enfocado en evaluar las alteraciones en los mecanismos de secreción en relación al daño glandular. Es sabido que algunas de las estructuras relacionadas con el transporte y secreción salival estarían alteradas durante el transcurso de la enfermedad (15, 36). Debido a la importancia del citoesqueleto en muchos de los procesos celulares, es probable que en los pacientes con el SS ocurran cambios en la organización del citoesqueleto que, entre otras cosas, estén relacionados con las alteraciones de la región apical de las células acinares y la deficiencia en la secreción salival (15). En la presente tesis se estudió la organización del citoesqueleto en pacientes con el SS, Síndrome de Sicca y en los que consultaron por sequedad bucal pero que no presentaban rasgos clínicos de afección glandular. Parece probable que alteraciones en componentes del citoesqueleto se relacionen con la disfunción glandular.

HIPÓTESIS

Modificaciones en la organización del citoesqueleto de actina de las células acinares de las glándulas salivales de enfermos con el SS estarían relacionadas con la redistribución de moléculas involucradas en su nucleación. El nuevo patrón de organización de la actina en la célula acinar alterada podría relacionarse con su disfunción secretora. Es factible que las células mioepiteliales, que recubren los acinos y que contribuyen a su función secretora, estén también alteradas en los pacientes con el SS.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la relación que existe; (a) entre la reorganización de la actina en las células acinares de enfermos SS y la de proteínas asociadas a su nucleación y función y (b) entre la organización de las células mioepiteliales y la severidad del daño acinar.

Objetivos específicos



- 1) Cuantificar mediante inmunofluorescencia el número de acinos con actina redistribuida en enfermos con diferentes grados de severidad del SS y compararlo con individuos controles. Los resultados serán cotejados con los datos clínicos de los pacientes tales como: presencia de anticuerpos, flujo salival, edad, etc.
- 2) Determinar mediante inmunofluorescencia la localización de proteínas asociadas a la nucleación de actina tales como ARP 2/3, WASp y profilina y en acinos de pacientes con el SS e individuos controles.
- 3) Estudiar mediante inmunofluorescencia, si la organización de las células mioepiteliales se modifica en los acinos alterados.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Pacientes y obtención de muestras

Las glándulas salivales labiales utilizadas para este estudio fueron obtenidas de los pacientes indicados en la Tabla 1. Estos corresponden a (a) pacientes que consultaron por sequedad bucal, pero que no presentaron rasgos clínicos de afección glandular, (b) pacientes con el Síndrome de Sicca, que presentan sequedad oral y/o ocular a causa de diversas etiologías que afectan a las glándulas, y (c) pacientes con el SS que cumplen con los criterios establecidos por el consenso Europeo/Americano del año 2002 para el diagnóstico de la enfermedad (1, 7). De acuerdo a lo anterior, los pacientes fueron clasificados en 3 grupos de estudio. El grupo 1 corresponde a los pacientes sin rasgos clínicos de afección glandular (n = 12). El grupo 2 corresponde a pacientes con el Síndrome de Sicca (n = 13), mientras que el grupo 3 corresponde a pacientes con el SS (n = 15).

De cada paciente se cuenta con un registro detallado de la evolución de su enfermedad consignado en su ficha médica. Las glándulas fueron extraídas por un cirujano dentista en la Clínica Indisa mediante una incisión en la cara interna del labio inferior utilizando anestesia local. Las muestras fueron fijadas inmediatamente para su procesamiento histológico.

II. Inmunofluorescencia

Las glándulas fueron fijadas por 3 horas a 20 °C en paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,125%, preparado en PBS 1X a un pH de 7,4. Después, fueron lavadas en PBS 1X con 3 cambios durante 90 min. Utilizando tijeras de disección, fue retirado el tejido adiposo de las glándulas, para luego embeberlas en sacarosa al 30% hasta su decantación. Posteriormente las glándulas fueron seccionadas a un espesor de 15 micrones utilizando un micrótopo de congelación (Leitz Wetzlar), colectando cada corte alternadamente en una placa plástica de 12 pocillos con 3 mL de PBS 1X, de modo de no mezclar cortes consecutivos en un mismo posillo. Las secciones obtenidas fueron permeabilizadas en Tritón X-100 (Sigma) al 0,2% preparado en PBS 1X, durante 3 horas y bloqueadas durante 90 min con BSA (albúmina de suero bovino) al 3%, preparada en PBS 1X y suplementada con azida de sodio al 0,2% y Tritón X-100 al 0,1%, para posteriormente incubarlas en un volumen de 50 µl de esta misma solución a 20 °C con agitación constante durante al menos 12 horas, utilizando los anticuerpos primarios respectivos indicados en la Tabla 2. Luego fueron lavadas con PBS 1X, bloqueadas durante 90 minutos e incubadas durante al menos 5 horas en anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos (Tabla 2). Otras secciones fueron incubadas con Faloidina marcada con TRITC, la cual revela actina-F. Finalmente, para visualizar lo núcleos, se incubaron los cortes en presencia de la sonda DAPI por 5 min. Las muestras fueron montadas sobre portaobjetos utilizando una solución de glicerol/PBS 1X en una proporción de 9:1.

Las inmunofluorescencias fueron observadas en un microscopio de fluorescencia invertido Zeiss 135, conectado a un motor Z (Prior) y una cámara CDD Hamamatsu modelo C5985. El procesamiento de imágenes y la cuantificación de acinos se realizaron utilizando el programa Metamorph 6.1.

Tabla 1. Listado de pacientes analizados.

| Nombre | Sigla | Edad | Biopsia * | Flujo * | A.cuerpos * | Diagnóstico * |
|---------------------------------|--------------|-------------|----------------------|--------------------|------------------------|---------------------------------|
| Flores Figueroa, Cecilia | FFC | 37 | S.Cr. 1 | 1.2 | Neg. | Sin sequedad |
| Pascual Urzúa, Carmen | PUC | 56 | S.Cr. 1 | 0.9 | Neg. | Sin sequedad |
| Arias, María Luz | AML | 48 | S.Cr. 2 | 2 | Neg. | Sequedad ocular |
| Toro Rojas, Paula | TRP | 42 | S.Cr. 2 | 4.6 | Neg. | Seq. Ocular Subjetiva |
| Alvarado Oyarzún, Yoana | AOY | 21 | S.Cr. 1 | 5 | Neg. | Sin sequedad |
| Loyola San Martín, Silvia | LSS | 53 | Normal | 5.2 | Neg. | Sequedad subjetiva |
| Ríos Guerra, Héctor | RGH | 36 | S.Cr. 1 | 6.2 | Neg. | Sin sequedad |
| Parra Reyes, Beatriz | PRB | 42 | S.Cr. 1 | 4 | Neg. | Sin sequedad |
| Veliz Veliz, Patricia | VVP | 39 | S Cr. 1 | 2.7 | Neg. | Sequedad ocular |
| Campos, María Jesús | CMJ | 26 | S.Cr. 1 | 5 | Neg. | Sin sequedad |
| Schtingre Grandón, Ivette | SGI | 38 | S.Cr. 1 | 3.0 | Neg. | Sequedad subjetiva |
| Barria Haro, Raquel | BHR | 46 | S.Cr. 1 | 0.3 | Neg. | Sequedad bucal |
| Oyarzún Muñoz, María | OMM | 36 | S.Cr. 2 | 0.4 | Neg. | Sicca, sequedad objetiva |
| George Manriquez, Carolina | GMC | 22 | S.Cr. 2 | 3 | Neg. | Sequedad ocular subjetiva |
| Olivares Sepúlveda, Bernarda | OSB | 53 | S.Cr. 1 | 1.6 | Neg. | Sequedad bucal subjetiva |
| Büchner Herrero, Patricia | BHP | 53 | S.Cr. 1 | 0.5 | Neg. | S. Sicca |
| Díaz Mancilla, Verónica | DMV | 48 | S.Cr. 1 | 5.8 | Neg. | Sequedad bucal subjetiva, FM |
| Eynaudi Álvarez, María | EAM | 58 | S.Cr. 3 | 1.3 | Neg. | S. Sicca |
| Flores Álvarez, Stefi | FAS | 50 | S.Cr. 1 | 3 | Neg. | Sequedad ocular |
| Leiva Silva, Ana | LSA | 57 | SF 1 | 4 | Neg. | S. Sicca |
| Cerda Sepúlveda, Raquel | CSR | 60 | S.Cr.3 4:1SF1 | 0.5 | Neg. | S. Sicca |
| Sanhueza Sanhueza, Graciela | SSG | 49 | S.Cr 2 | 2.8 | Neg. | S. Sicca |
| Gómez Ramírez, Dina | GRD | 52 | S.Cr. 3 | 1.6 | Neg. | S. Sicca |
| Toledo Álvarez, María Elena | TAM | 51 | SF 3 | 3.3 | Ro (+) La (+) ANA | SS |

| | | | | | | |
|------------------------------|-----|----|-------------|-----|----------------------|----|
| Burgos Norambuena, América | BNA | 56 | S.Cr. 2-3 | 0.9 | Ro (+) La (+) ANA | SS |
| Tapia Salinas, Cecilia | TSC | 43 | S.Cr 2 | 2.3 | Ro (+) La (+) ANA | SS |
| Díaz Valdés, Pamela | DVP | 28 | 4:2 SF 2 | 1.2 | Ro (+) La (-) | SS |
| Luna Ibarra, Margarita | LIM | 49 | 4:1 | 0 | Ro (+) La (+) | SS |
| Vergara Torres, Ester | VTE | 41 | SF 4 | 0 | ANA | SS |
| Valdés Repening, María | VRM | 28 | SF 3 | 0.5 | Ro (+) La (+) ANA | SS |
| Herrera Zapata, Gema | HZG | 49 | 4:1 SF 2 | 0.1 | Ro (+) La (+) ANA | SS |
| Molina Gonzáles, María | MGM | 53 | 4:1 SF 1 | 5.3 | Ro (+) La (-) ANA | SS |
| Díaz Cerda, Ingrid | DCI | 39 | 4:1 | 1.7 | Ro (+) ANA | SS |
| Urrea Ponce, María | UPM | 50 | 4:3 SF>7 | 0 | Ro (+) La (+) ANA | SS |
| Nova Stuardo, Sara | NSS | 53 | 4:1 | 0 | ANA | SS |
| Urbina Carvajal, Maria Elena | UCM | 48 | 4:3 | 0 | Ro (+) La (+) ANA | SS |
| Miranda Cofre, Ana | MCA | 54 | SF 7 | 0.1 | Ro (+) ANA | SS |

*Biopsia: S. Cr: Sialoadenitis Crónica; SF: Score Focal. Normal: sin infiltrado linfocitario.

*Flujo: Volumen de flujo salival no estimulado por minuto (mL/min).

*A.cuerpos: Anti-anticuerpos relacionados con el SS.

*SS: Síndrome de Sjögren. FM: Fribromialgia.

NOTA: De los pacientes AAF (SS), BDL (S. Sicca) y GBB (Sequedad Subjetiva), no se recopilieron sus datos clínicos a la fecha de escritura.

III. Recuento de Acinos según la localización de la actina

Para el recuento de los acinos normales y alterados se utilizó como marcador la manera como se organizaba el citoesqueleto de actina. Utilizando el programa Metamorph 6.1, se eligieron al azar campos tisulares de 280x280 μm^2 de área a partir de “stacks” de imágenes adquiridas cada 1 μm en el eje Z mediante un microscopio de fluorescencia a un aumento total de 400x. Se analizaron 30 áreas por paciente.

Basados en la apariencia estructural de los acinos, tamaño y distribución de la actina, éstos fueron clasificados en 6 categorías (Tabla 3), las que fueron agrupadas según:

- 1) **Acinos normales:** (tipo 1a y 1b), caracterizados por poseer un citoesqueleto de actina periférico de espesor regular, que se extiende por todo el perímetro celular.
- 2) **Acinos alterados:** (tipos 2a, 2b y 3), estos presentan desorganización general del citoesqueleto de actina, manifestada en su acumulación en la región basal de las células. La capa de actina periférica en otras regiones de la célula es más delgada o ausente.
- 3) **Acinos Inclasificables:** (tipo 4) Estructuras que no pueden ser clasificadas como acinos normales o alterados.

En relación al diámetro de los acinos, estos se clasificaron en “**acinos pequeños**” (diámetro entre 20 a 45 μm), y “**acinos grandes**” (diámetro

superior a 45 μm), los cuáles según la tinción con Hematoxilina y Eosina corresponden a acinos de tipo seroso y mucoso respectivamente.

IV. Tinción con Hematoxilina/Eosina

Los cortes de glándulas salivales fueron lavados en agua destilada por una hora y teñidos en una gota de Hematoxilina de Harris durante 7 minutos. El exceso de tinción fue removido lavando por 10 minutos con agua destilada. Posteriormente los cortes fueron teñidos con una gota de Eosina durante 3 minutos y lavados en agua destilada por 10 minutos. Finalmente, los cortes fueron montados en portaobjetos utilizando una solución de glicerol/PBS 1X en una proporción de 9:1.

V. Microscopía electrónica

Las glándulas fueron fijadas durante 2 horas a 20 °C en la solución de Karnovsky (15, 42), diluída 1:1 con agua destilada (Karnovsky 50%). Luego fueron lavadas en buffer cacodilato 0,1M, deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol, pasadas por el intermediario óxido de propileno y después por mezclas de óxido de propileno con Epón 812 (Electron Microscopy Sciences), al vacío. Los bloques con fragmentos de las glándulas fueron seccionados a un espesor de aproximadamente 60 nm en un ultramicrotomo (Sorvall MT5000). Las secciones finas fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo, para luego observarlas utilizando un microscopio electrónico de transmisión (Phillips Tecnai 12, Biotwin), a 80 Kvolts.

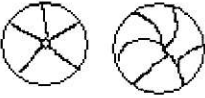
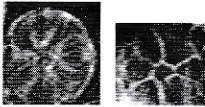
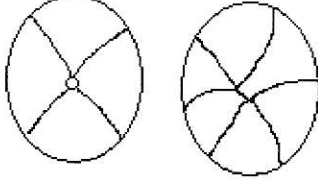
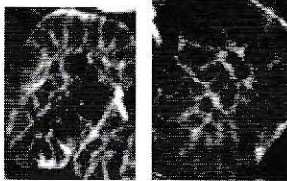
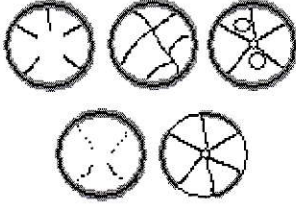
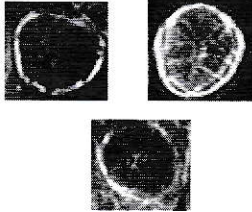
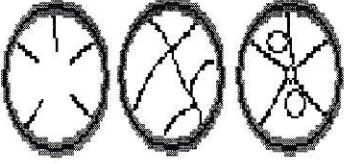

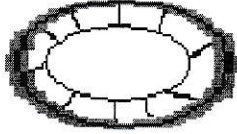

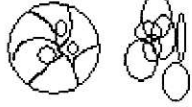

VI. Análisis estadístico

Para comparar las medias muestrales de los datos recopilados, se utilizó el test de ANOVA, considerando valores de $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativos. Los análisis fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism 5.0.

Tabla 2. Anticuerpos y sondas utilizadas para la inmunofluorescencia.

| Anticuerpos primarios | Isotipo | Dilución | Productor |
|---------------------------------|--------------------------|-----------------|------------------|
| anti α -tubulina | IgG monoclonal de ratón | 1:200 | Sigma |
| anti actina | IgM monoclonal de ratón | 1:100 | Calbiochem |
| anti WASp | IgG policlonal de conejo | 1:100 | Cytoskeleton |
| anti Arp3 | IgG policlonal de oveja | 1:50 | Cytoskeleton |
| Anti cofilina | IgG policlonal de conejo | 1:50 | Cytoskeleton |
| anti citoqueratina 18 | IgG monoclonal de ratón | 1:100 | Santa Cruz |
| anti citoqueratina 14 | IgG monoclonal de ratón | 1:50 | AbCam |
| anti β -catenina | IgG policlonal de conejo | 1:100 | Sigma |
| anti Lc3b | IgG policlonal de conejo | 1:100 | Cell Signaling |
| Anticuerpos secundarios | Fluoróforo | Dilución | Productor |
| anti IgM de ratón | Cy2 | 1:100 | Jackson |
| anti IgG de ratón | Alexa fluor 488 | 1:300 | Molecular Probes |
| anti IgG de ratón | Alexa fluor 594 | 1:300 | Molecular Probes |
| anti IgG de conejo | Alexa fluor 488 | 1:300 | Molecular Probes |
| anti IgG de conejo | Alexa fluor 594 | 1:300 | Molecular Probes |
| Sondas | | Dilución | Productor |
| Faloidina TRITC | | 1:100 | Sigma |
| 4.6-diamino-2-fenilindol (DAPI) | | 1:100 | Sigma |
| Dil | | 1:300 | Molecular Probes |

Tabla 3. Clasificación de los acinos según su tamaño y distribución de la actina

| Tipo | Nombre | Representación | Imagen | Descripción |
|-------------|---|---|--|---|
| 1a | Acinos normales pequeños (Serosos) |  |  | Acinos pequeños (20 a 40 μm) con un citoesqueleto de actina periférico que se extiende por el perímetro celular. |
| 1b | Acinos normales grandes (Mucosos) |  |  | Acinos grandes (45 a 80 μm) con un citoesqueleto de actina periférico que se extiende por el perímetro celular. |
| 2a | Acinos alterados pequeños y desorganizados con actina acumulada (Serosos) |  |  | Acinos pequeños (20 a 40 μm), con desorganización interior y que presentan actina acumulada en su región basal, con disminución o ausencia de actina en la región apical. |
| 2b | Acinos alterados grandes y desorganizados con actina acumulada (Mucosos) |  |  | Acinos grandes (45 μm o más) con actina acumulada y desorganización interior. |
| 3 | Acinos alterados muy grandes con actina acumulada. (Mucosos) |  |  | Acinos de gran diámetro (55 a 80 μm o más) con actina acumulada en su parte basal y lumen voluminoso. |
| 4 | Inclasificables |  |  | Estructuras que probablemente correspondan a acinos mal preservados o en vías de destrucción. |

RESULTADOS

Estructura de los acinos de las glándulas salivales labiales

Una primera aproximación al estudio de la estructura de las glándulas salivales labiales de los pacientes se realizó en secciones teñidas con Hematoxilina/Eosina. Por su tamaño y coloración se identificaron tres tipos de acinos. Los acinos serosos son redondeados, tienen un diámetro de 20 a 40 μm y se tiñen de color violeta intenso. Los acinos mucosos se ven redondeados u ovalados. Son de mayor tamaño que los serosos (sobre 40 μm de diámetro), y su pálida coloración se debe a la mucina almacenada en el citoplasma. Los acinos mixtos corresponden a acinos mucosos en cuya periferia se acomodan acinos serosos llamados semilunas de Gianuzzi.

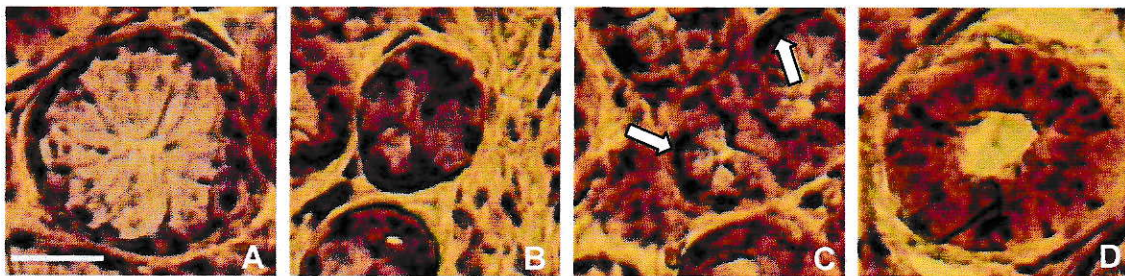


Figura 4. Acinos coloreados con Hematoxilina/Eosina. En (A) se muestra un acino mucoso, en (B) dos acinos serosos, en (C) la posición de las flechas indican hacia semilunas de Gianuzzi de acinos mixtos. En (D) se muestra un conducto excretor. Barra = 40 μm .

Estructura de las glándulas salivales labiales

En los pacientes del grupo 1 se observó glándulas salivales con un abundante parénquima y con algunos linfocitos de distribución difusa. Esto representa la organización de una glándula salival normal. En los pacientes del grupo 2, la presencia del parénquima disminuye, observándose una menor cantidad de acinos, muchos de morfología alterada, además, de la presencia de un infiltrado linfocitario difuso. Los pacientes del grupo 3 presentan también una disminución en su parénquima, con una notable reducción en el número de acinos, mientras, el infiltrado linfocitario es de carácter focal, distribuyéndose de preferencia en las cercanías de los conductos y alrededor de los acinos.

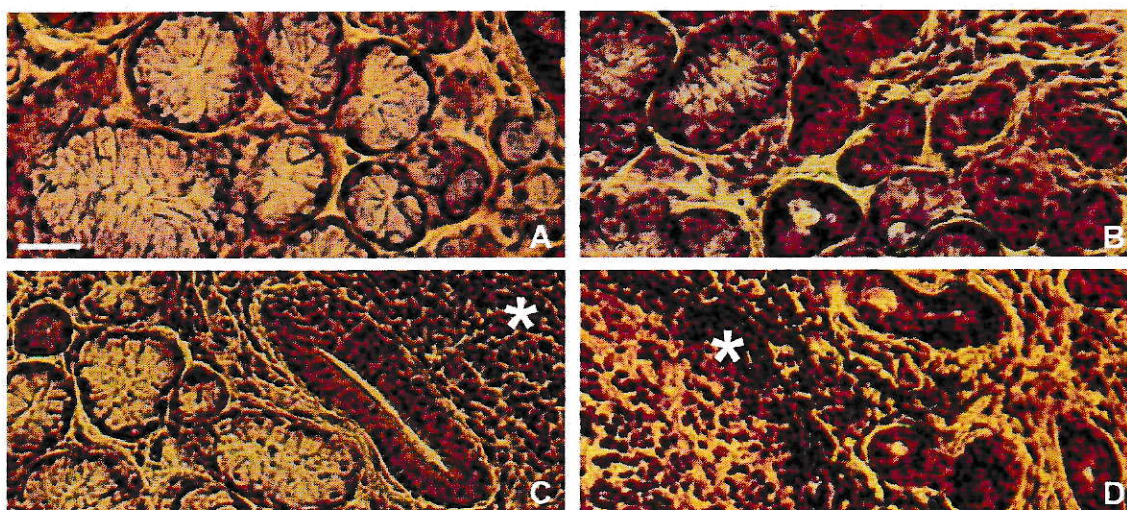


Figura 5. Tinción de Hematoxilina/Eosina. En (A) se muestra la estructura de los acinos de un paciente del grupo 1, en (B) del grupo 2. En (C) y (D) se muestran las glándulas de pacientes del grupo 3 con un SS leve y severo respectivamente. Nótese que en estos últimos ocurre un aumento del infiltrado linfocitario (asteriscos blancos) y una disminución del número de acinos. Barra = 40 μ m.

Organización del citoesqueleto de actina

En los pacientes del grupo 1 se observaron 2 poblaciones de acinos de acuerdo a la distribución de la actina. En muchos acinos, la actina está presente en la periferia de las regiones apical y basolateral de las células, extendiéndose, así, por todo el perímetro celular, lo cual corresponde a la organización descrita en la literatura como la de acinos normales (1, 52). En otros acinos, la actina se encuentra acumulada en la región basal, fenómeno que solía coincidir con otros signos de desorganización, tales como un aumento en el lumen acinar y deterioro estructural de la región apical. Hemos considerados a estos acinos como anormales, por lo que les llamamos “acinos alterados”. En los acinos que no poseen signos de desorganización, la aumentada señal de actina basal puede corresponder a la actina perteneciente a las células mioepiteliales que se encuentran en contacto con la región basal de los acinos. De acuerdo a estas observaciones, la organización del citoesqueleto de actina parece ser un buen indicador del estado estructural del acino.

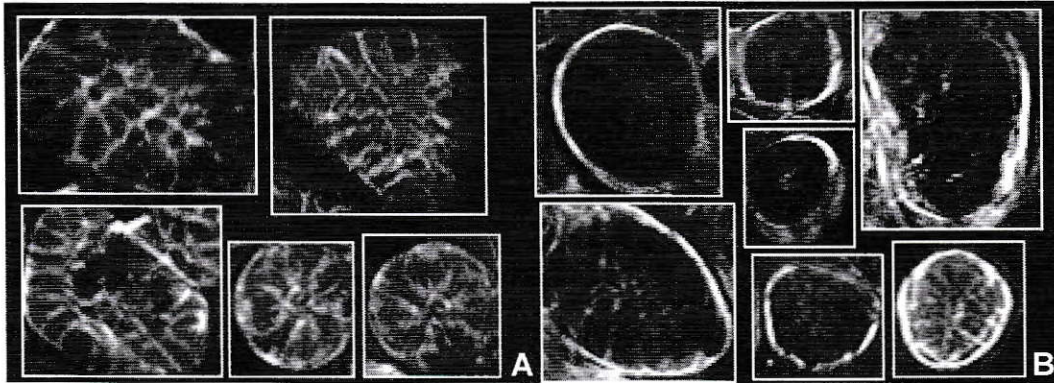


Figura 6. Organización del citoesqueleto de actina en acinos de glándulas salivales labiales. En (A) se muestra acinos normales y en (B) acinos alterados. En los últimos, la actina se acumula en la región basolateral y disminuye, o parece estar ausente, en la región apical.

La frecuencia de acinos alterados en los pacientes de los grupos 2 y 3 fue mayor a la observada en los pacientes del grupo 1. Los pacientes con mayor grado de severidad en su enfermedad poseen casi solamente acinos alterados.

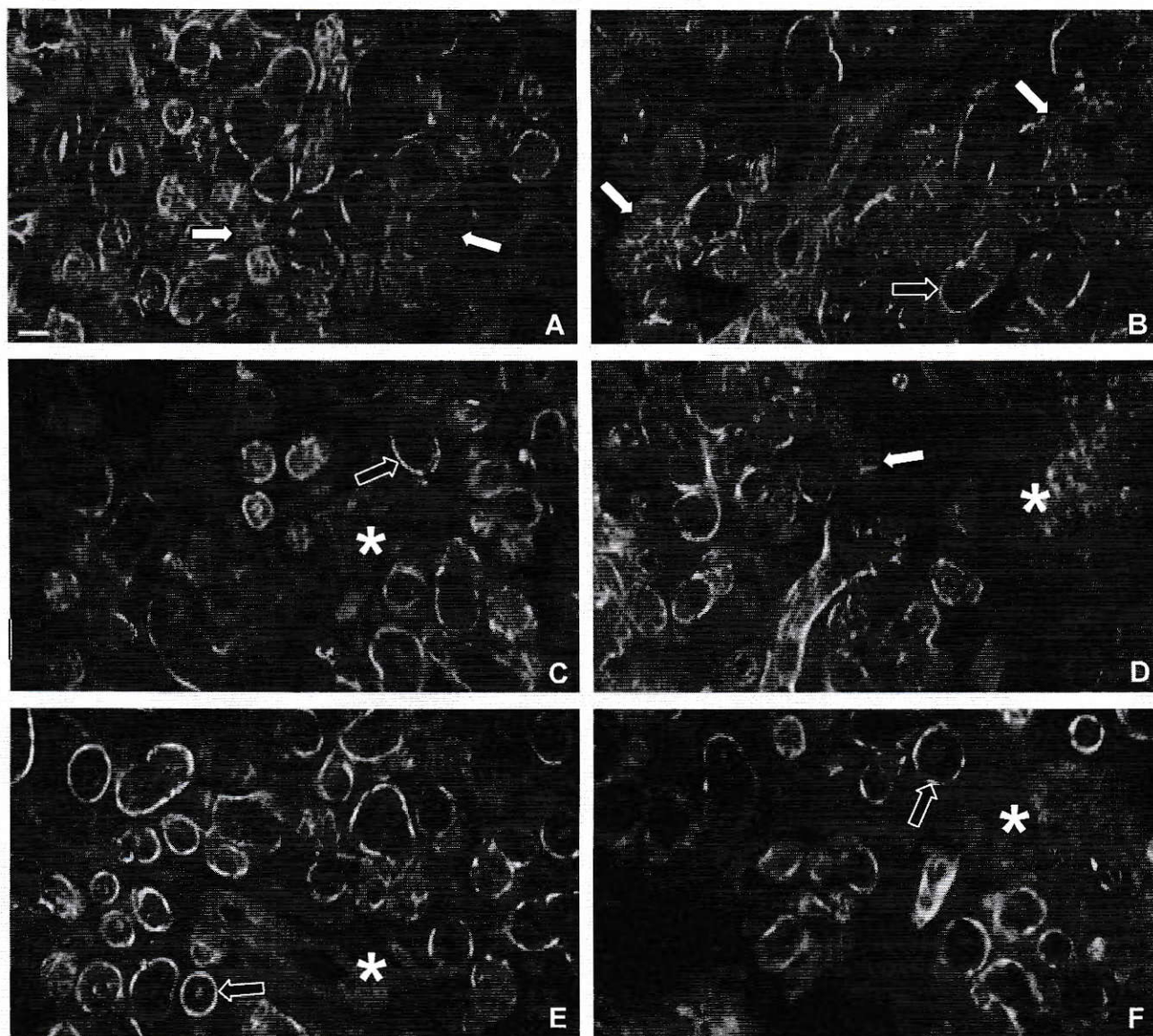


Figura 7. Distribución de actina en acinos de pacientes de los grupos 1, 2 y 3. En (A) y (B) se muestran secciones por la glándula de dos pacientes del grupo 1, en los cuales se observan numerosos acinos normales (indicados por flechas blancas en toda la figura) y algunos alterados (indicados por flechas negras en toda la figura). En (C) se muestra la sección glandular de un paciente del grupo 2, en el que la cantidad relativa de acinos es menor, y la mayoría de estos están alterados, con actina acumulada en su región basal. En (D), (E) y (F) se muestran secciones por la glándula de pacientes del grupo 3. Las figuras (C) a (F) muestran la disminución de acinos y el aumento del área correspondiente al estroma (asteriscos blancos). Barra = 40 μ m.

La acumulación de actina en la región basal de las células acinares alteradas y el deterioro de su región apical fueron también observadas en microfotografías electrónicas (Figura 8).

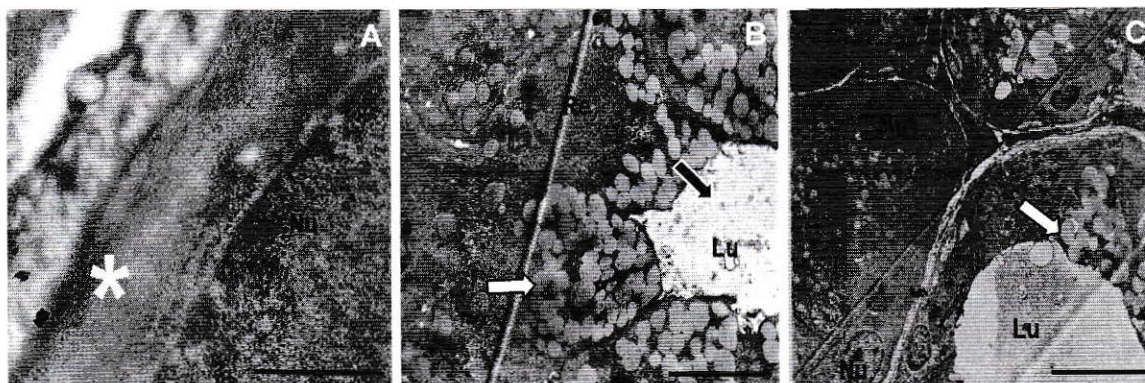


Figura 8. Microfotografía electrónica de acinos alterados. En (A) el asterisco blanco marca la posición de la banda de actina basal de un acino alterado. En (B) la flecha negra apunta hacia el lumen acinar dilatado, mientras que las flechas blancas en (B) y (C) apuntan hacia gránulos de secreción localizados en la región apical. Barras= (A) 0,8 μm , (B) 5 μm y (C) 11 μm (Lu: lumen acinar; Nu: núcleo, Re: retículo endoplásmico).

Recuento del número de acinos

Utilizando la información obtenida mediante inmunofluorescencia relacionada con la organización del citoesqueleto de actina, se realizó un recuento del número de acinos normales y alterados de cada uno de los pacientes estudiados.

El número promedio de acinos por área de estudio para los pacientes del grupo 1 fue de 28, mientras que para el grupo 2 y 3 este número disminuyó a 20 y 15 respectivamente. Obviando los acinos inclasificables, alrededor de la mitad de los acinos de los pacientes del grupo 1 correspondían a acinos normales,

mientras que la otra mitad a acinos alterados. En los pacientes de los grupos 2 y 3, el promedio de acinos normales disminuyó en comparación a la del grupo 1, mientras que el promedio de acinos alterados para los 3 grupos fue similar.

Tabla 4. Datos promedios para cada grupo de estudio. Los parámetros correspondientes al grupo 1 representan a una glándula normal, mientras que los del grupo 2 y 3 a pacientes enfermos.

| Datos | Grupo1 | Grupo2 | Grupo3 (SS) |
|---|-------------|-------------|-------------|
| Nº de pacientes | 12 | 13 | 15 |
| Edad promedio | 41 | 49 | 46 |
| Flujo salival promedio | 3,5 | 2,0 | 1,0 |
| Promedio de acinos totales por área de estudio | 28 | 20 | 15 |
| Promedio acinos normales por área de estudio | 10 | 4 | 2 |
| Promedio acinos alterados por área de estudio | 9 | 8 | 7 |
| Promedio acinos inclasificables por área de estudio | 9 | 8 | 6 |
| Cuociente acinos normales / acinos alterados | 1,11 | 0,41 | 0,29 |

Con los datos recopilados se determinó el cuociente entre la cantidad de acinos normales y acinos alterados (Figura 9). Los pacientes del grupo 1 tienen un cuociente cercano a 1, mientras que los pacientes del grupo 2 y 3 tienen cuocientes inferiores a 0,8, el que en algunos casos alcanzó valores cercanos a 0. Esto sugiere que en los pacientes del grupo 1 la cantidad de acinos normales y alterados es similar, mientras que en los grupos de pacientes enfermos, predominan los acinos alterados.

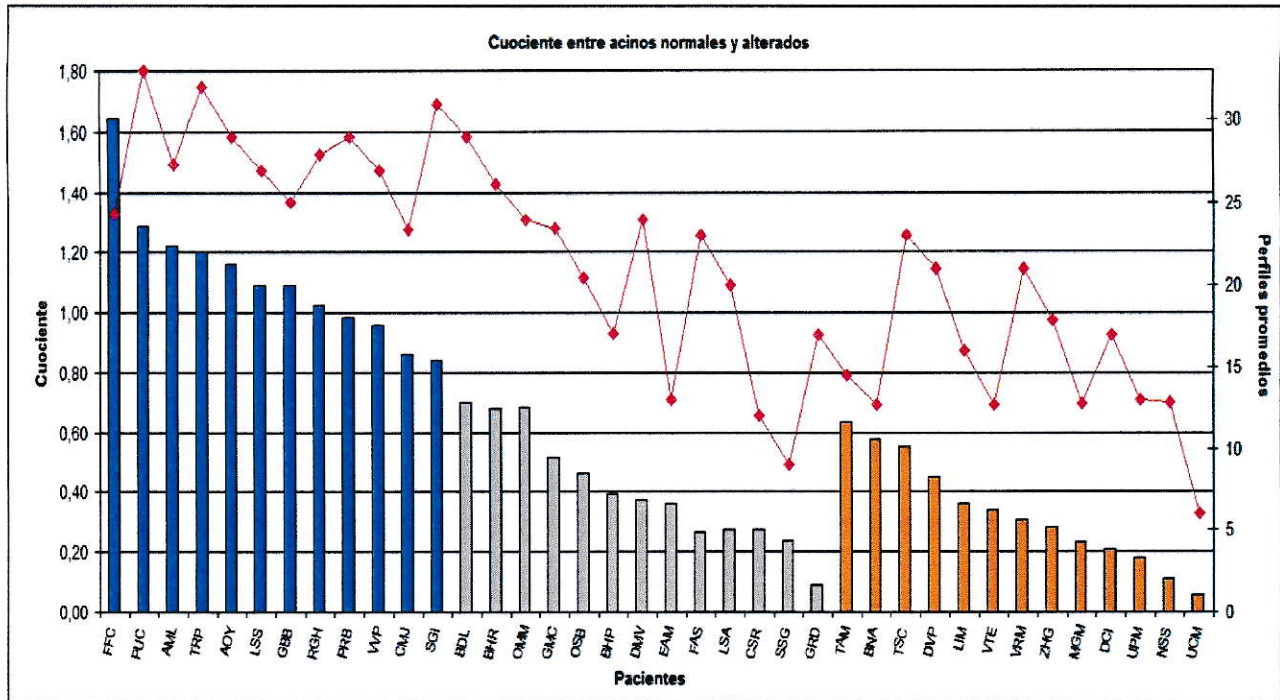


Figura 9. Cociente entre el número de acinos normales y alterados por área de estudio. En azul se muestran los pacientes del grupo 1, mientras que en gris los del grupo 2. Las barras anaranjadas corresponden a los pacientes del grupo 3. La curva roja indica el número promedio de acinos por área para cada paciente. En el conjunto de los pacientes del grupo 1, la cantidad de acinos normales es cercana a la de acinos alterados (aproximadamente 1:1), mientras que en los pacientes del grupo 2 y 3 el número de acinos alterados es mayor que el de acinos normales (aproximadamente 2:1). Nótese que en los grupos 2 y 3 a medida que el cociente disminuye el número de perfiles por área también disminuye.

Los datos del recuento fueron expresados como porcentaje de acinos por área de estudio (Figura 10). Los pacientes del grupo 2 y 3 mostraron un menor porcentaje de acinos normales que los pacientes del grupo 1 (5 a un 20% dependiendo de la severidad de su enfermedad, frente a un 30% de acinos normales para los pacientes del grupo 1). El porcentaje de acinos alterados fue mayor en los pacientes del grupo 2 y 3 (35% a 60% para los pacientes del grupo 2 y 3, y alrededor de un 35% para los pacientes del grupo 1). Los acinos

inclasificables representaron entre un 30 a un 40% de las estructuras presentes en un área de estudio, mientras que en los caso con un SS más severo alcanzaron valores sobre un 50%, sugiriendo que en estos pacientes el deterioro de los acinos es mayor.

Los datos de cada grupo fueron promediados y analizados mediante el test de ANOVA ($p \leq 0,05$), para determinar la existencia de diferencias entre las medias muestrales de cada grupo respecto a la cantidad de acinos normales, alterados e indefinidos. Las medias de los acinos normales, acinos indefinidos y el promedio de perfiles por área de estudio mostraron ser estadísticamente distintos en los 3 grupos, mientras que por el contrario, los acinos alterados tenían una media muestral similar en los 3 grupos, lo cual indica que no existen variaciones significativas en la cantidad de acinos alterados por área de estudio entre los 3 grupos. Este resultado sugiere que la disminución en la cantidad de acinos se debería en parte a la desaparición de los acinos normales.

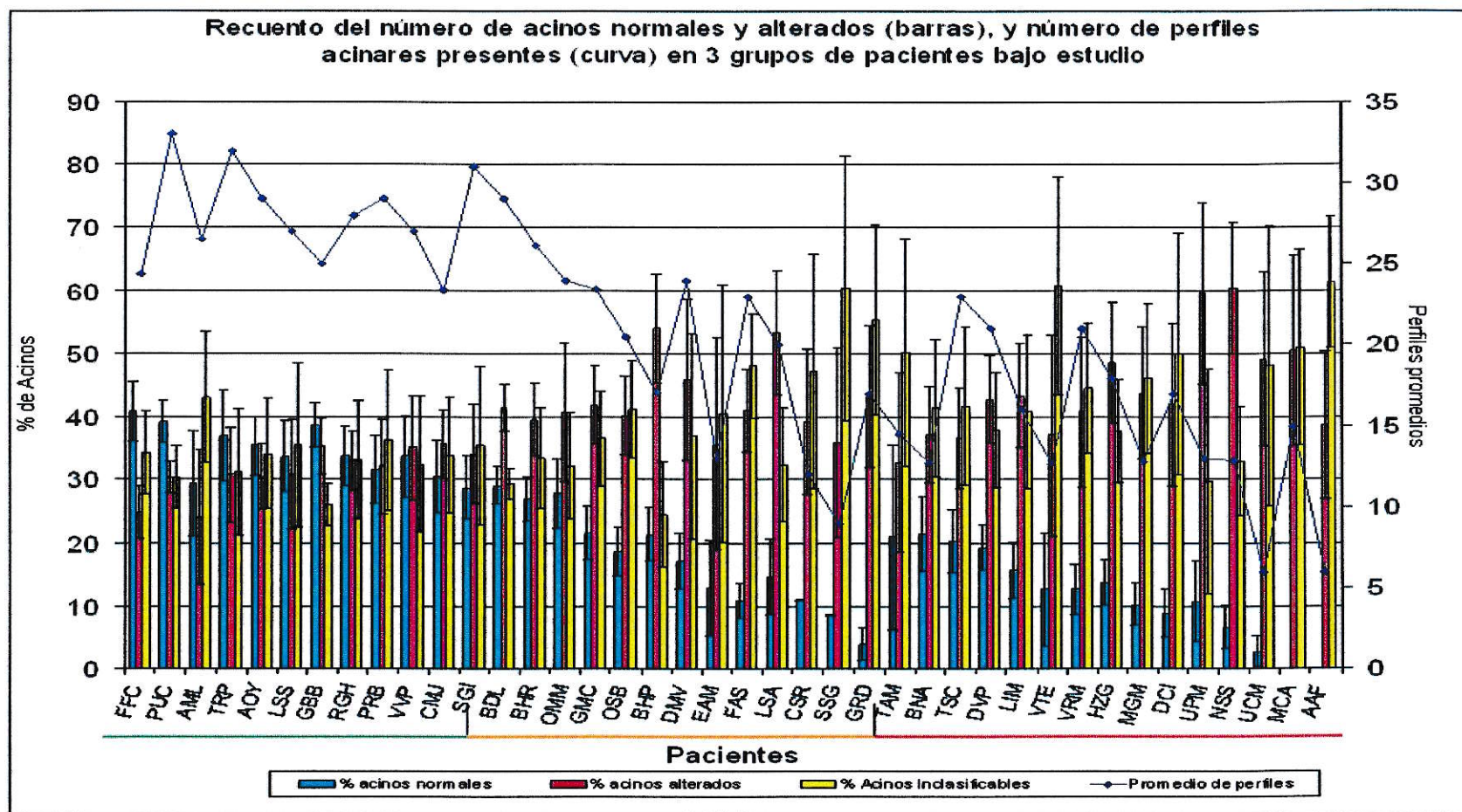


Figura 10. Porcentaje de acinos normales y alterados según la organización del citoesqueleto de actina en 3 grupos de pacientes estudiados (n=40). El primer grupo de pacientes (subrayado en verde), corresponde a pacientes que consultaron por sequedad bucal, pero que no presentaron rasgos clínicos de afección glandular, mientras que el segundo grupo (subrayado en anaranjado) corresponde a pacientes con disfunción glandular de distinta etiología. El tercer grupo (subrayado en rojo) está compuesto por pacientes con el SS. En cada grupo, los pacientes fueron ordenados de mayor a menor cociente entre acinos normales y alterados. Los pacientes del grupo 1 presentaron, en su mayoría, una relación cercana a 1:1 en la cantidad de acinos normales y alterados, mientras que los grupos 2 y 3 se inclinan hacia una mayor presencia de acinos alterados, alcanzando relaciones de 2:1 con respecto a los acinos normales. Nótese que el promedio de acinos por área de estudio (curva azul) tiende a disminuir a medida que disminuye el porcentaje de acinos normales y aumenta el porcentaje de acinos alterados.

Tabla 6. Valores de p obtenidos a través del test de ANOVA. Los valores de p para los acinos normales e inclasificables fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) para los 3 grupos, lo que indica que las medias muestrales de estos grupos son distintas entre sí. Por otro lado, los acinos alterados poseen una media muestral similar entre los 3 grupos.

| ANOVA | Normales | Alterados | Inclasificables | Nº Perfiles |
|--|----------|-----------|-----------------|-------------|
| P value | P<0.0001 | 0,0756 | 0,001 | P<0.0001 |
| Son las medias significativamente diferentes? (P < 0.05) | Sí | No | Sí | Sí |
| F | 62,13 | 2,789 | 8,545 | 26,06 |

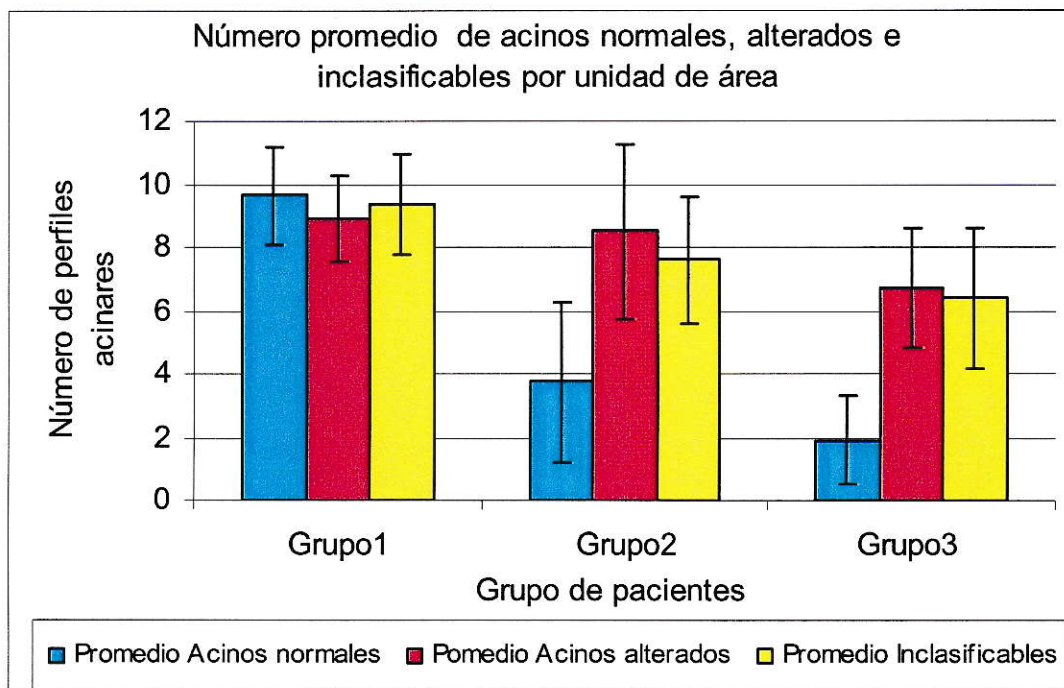


Figura 11. Número promedio de acinos presentes por área de estudio. Nótese que en los tres grupos de pacientes la cantidad promedio de acinos alterados se mantiene constante mientras que la de los acinos normales disminuye.

Localización de proteínas asociadas a la nucleación de actina y de otras proteínas del citoesqueleto

Durante el estudio de la organización del citoesqueleto de actina, pareció razonable pensar que la acumulación de actina basal estuviera acompañada de la redistribución de otras proteínas responsables de su nucleación. Para abordar esto, se realizó inmunofluorescencia para detectar WASp, Arp3 y profilina. Se observó que en los acinos normales, tales proteínas poseen una distribución citoplasmática y codistribuyen con la actina en las regiones apical y basolateral, mientras que en los acinos alterados, estas se presentan en la región basal junto a la actina acumulada. Esto fue aún más frecuente en los pacientes de los grupos 2 y 3, en los cuales gran parte de sus acinos son anormales.

Por otro lado, estudiamos la distribución de miosina II en relación al citoesqueleto de actina debido a su papel en la contracción que realizan en conjunto. En los acinos normales, la miosina II se distribuía por la periferia citoplasmática apical y basolateral, mientras que en los acinos alterados la miosina II se acumulaba en la región basal, codistribuyendo con la actina. Esta observación sugiere que la redistribución de actina se acompaña de la redistribución de sus proteínas asociadas.

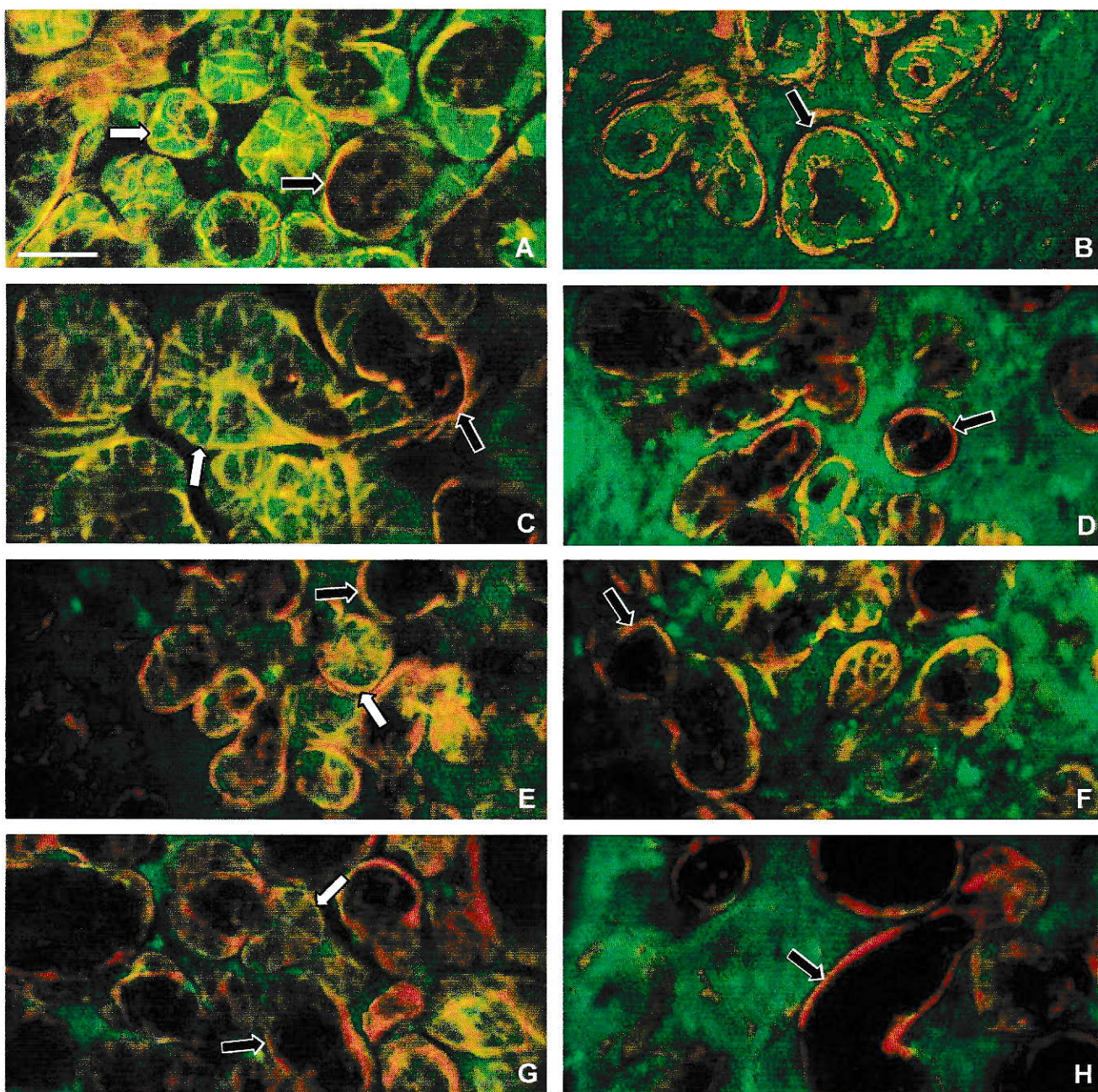


Figura 12. Distribución de actina y de algunas de sus proteínas asociadas. En tonos verdes se muestra la distribución de algunas de las proteínas asociadas a actina (A y B: Arp3, C y D: Wasp, E y F: Profilina, G y H: Miosina II). En amarillo-anaranjado, se muestra la colocalización entre actina y las proteínas estudiadas. Los pacientes del grupo 1 (A, C, E y G) poseen acinos normales (flechas blancas) y alterados (flechas negras), mientras que los pacientes del grupo 3 (B, D, F y H), poseen en su mayoría acinos alterados (flechas negras). Nótese en tono verde-amarillento la distribución citoplasmática de las proteínas estudiadas en los acinos normales, y en color amarillo-anaranjado la colocalización entre actina y las proteínas asociadas. Barra = 40 μ m.

En base a los resultados anteriores, pareció importante estudiar la organización de otros componentes del citoesqueleto, tales como los microtúbulos y filamentos intermedios. En relación a los filamentos intermedios, se estudió la organización de la citoqueratina 18, proteína que es expresada en epitelios simples, así como también en células secretoras de epitelios complejos. Se observó que en células normales la citoqueratina 18 se distribuye en el citoplasma, acumulándose particularmente en la periferia citoplasmática. En cambio, en los acinos alterados la citoqueratina 18 se encuentra esencialmente en la periferia citoplasmática, sin observarse en la región central de los acinos. Respecto a los microtúbulos, en las células acinares normales estos se distribuyen por todo el citoplasma, mientras que en las células acinares alteradas, los microtúbulos desaparecen de la zona citoplasmática apical, persistiendo en la región basolateral. Al estudiar simultáneamente la organización del citoesqueleto de actina y la de los microtúbulos, se observó que en acinos alterados el fenómeno de actina redistribuida y la desorganización de los microtúbulos ocurría simultáneamente. Estas observaciones sugieren que los cambios del citoesqueleto de actina ocurre en conjunto a otros componentes del citoesqueleto celular.

Una observación relevante fue la presencia de agregados tubulares de origen desconocido en la matriz extracelular, detectados mediante inmunofluorescencia y microscopía electrónica. Las observaciones realizadas sugieren que estos agregados podrían corresponder a microtúbulos (mostrados en Figura 13).

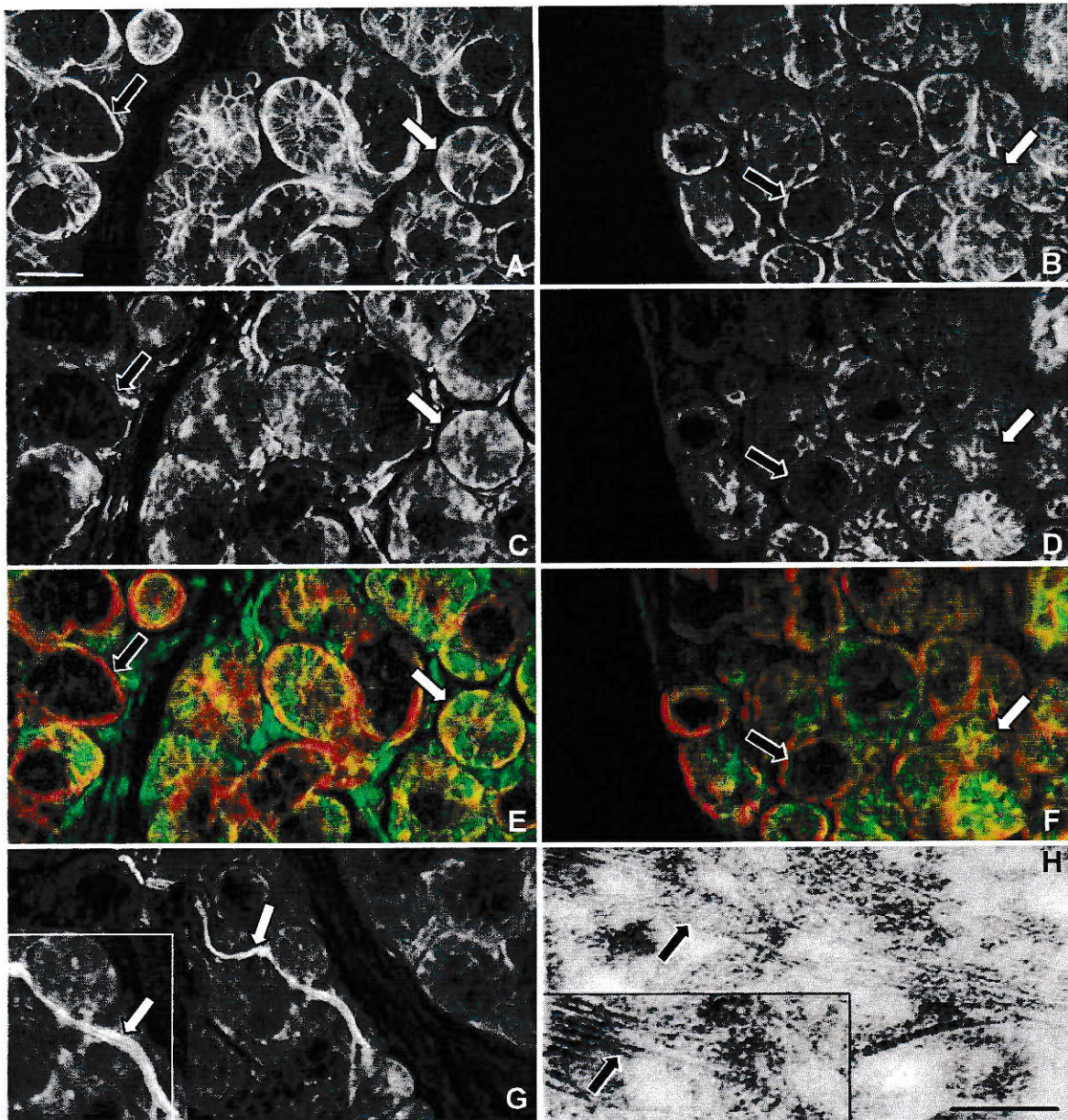


Figura 13. Organización de los filamentos de actina, microtúbulos y citoqueratina 18. Las figuras (A) y (C) muestran la organización de la actina y de los microtúbulos respectivamente. En (E) se muestra una combinación pseudocoloreada de ambas imágenes, con la actina en rojo y los microtúbulos en verde. En (B) y (D) se muestra la actina y la citoqueratina 18. En (F) se muestra una combinación pseudocoloreada de ambas imágenes, con la citoqueratina 18 en verde. Las flechas blancas apuntan a acinos normales, mientras que las flechas negras apuntan a acinos alterados. Nótese la disminución citoplasmática de los microtúbulos y de la citoqueratina 18 en los acinos alterados. En (G) la flecha blanca apunta hacia un agregado de microtúbulos, ampliado en el inserto. En (H) se muestra una microfotografía electrónica de estructuras tubulares extracelulares, indicadas por la flecha negra en el inserto. Barra = 40 μ m. En (h) barra = 600 nm.

Organización de las células mioepiteliales

Utilizando un anticuerpo contra la citoqueratina 14, marcador específico de células mioepiteliales y ductales, se correlacionó la distribución de las células mioepiteliales con la organización del citoesqueleto de actina de las células acinares. Se identificaron 3 situaciones: a) presencia de células mioepiteliales en asociación con acinos alterados cuya actina estaba acumulada en la región basal, (b) células mioepiteliales asociadas a acinos alterados, pero en regiones que carecían de actina acumulada y c) se identificaron células mioepiteliales en asociación a acinos normales. Gran parte de los perfiles de células mioepiteliales estaban asociados a acinos alterados, mientras que un menor número de estos fueron observados en asociación con acinos normales. Esto sugiere que la actina perteneciente a las células mioepiteliales en algunos casos sumaría su señal de actina a la acumulada de los acinos alterados (Figura 14).

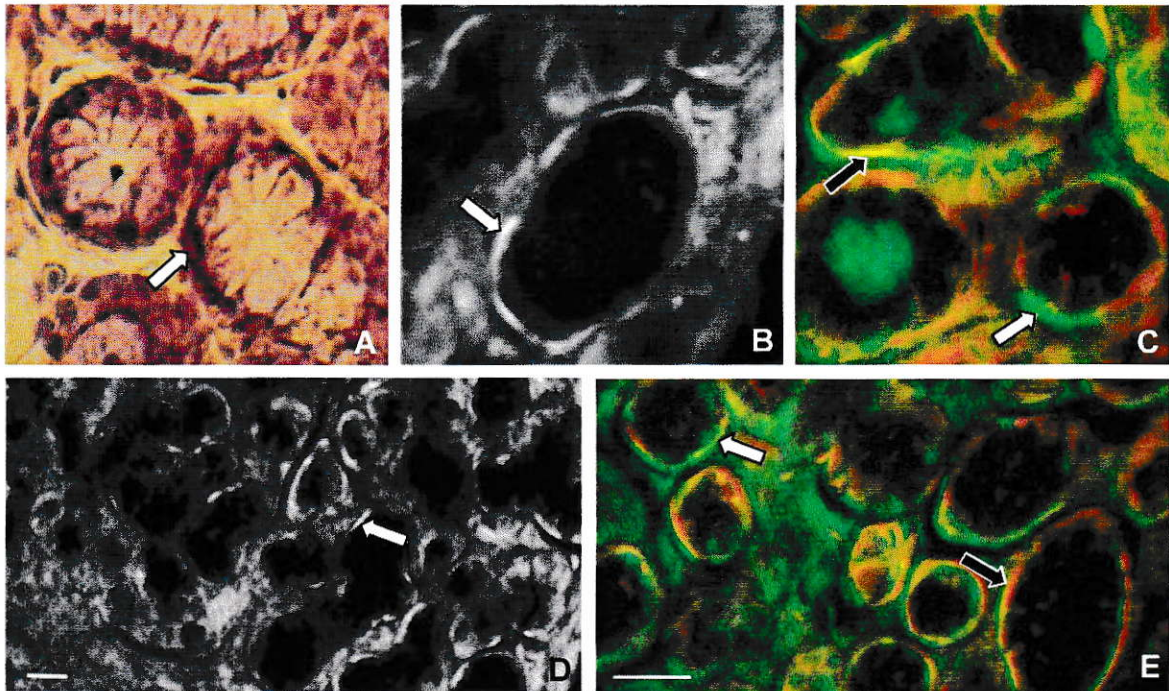


Figura 14. Distribución de células mioepiteliales. La figura (A) muestra una tinción de Hematoxilina/Eosina en donde la flecha blanca apunta hacia el perfil de una célula mioepitelial en la periferia de un acino, coloreada de violeta intenso. En la figura (B) la flecha blanca apunta hacia el perfil de una célula mioepitelial identificada mediante inmunofluorescencia. En la figura (C) se muestra la combinación pseudocoloreada para actina y citoqueratina 14 (en verde), en donde la flecha blanca apunta hacia el perfil de una célula mioepitelial que no codistribuye con la actina acumulada de un acino alterado, mientras que la flecha negra apunta hacia un perfil que sí codistribuye con la actina acumulada de un acino alterado. En la figura (D) se muestra una inmunofluorescencia para citoqueratina 14 en donde se observan variados perfiles de células mioepiteliales asociados a estructuras acinares, mientras que en (E) se muestra una combinación entre actina y citoqueratina 14, pseudocoloreadas en rojo para actina y verde para citoqueratina 14, en donde las flechas apuntan hacia perfiles de células mioepiteliales en asociación a actina acumulada (flecha negra) y sin asociación a actina acumulada (flecha blanca). Barras = 40 μ m.

Como el aumento de la actina en la región basal de los acinos podría ser consecuencia de la suma de la actina proporcionada por las células acinares así como mioepiteliales, se realizó un recuento del número de perfiles de células mioepiteliales presentes alrededor de los acinos. De los 11 pacientes estudiados (TSC, GRD, SGI, OMM, DCI, LSA, MCA, VRM, AAF, BDL y GBB), sólo 1 paciente (AAF) presentó escasos perfiles de células mioepiteliales asociados a un número menguado de acinos. Este paciente padece de un SS avanzado con deterioro glandular, lo que explica el mal estado glandular. Los datos recopilados para el recuento de células mioepiteliales fueron agrupados y representados en un gráfico (Figura 15), que muestra el número promedio de perfiles de células mioepiteliales asociadas a acinos normales y alterados. El recuento mostró que un número mayor de perfiles de células mioepiteliales se encuentran asociados a acinos alterados. El análisis de varianza (ANOVA), realizado para comparar los pacientes estudiados (excluyendo AAF), determinó que el número de perfiles asociados a acinos alterados no presentaba diferencias significativas entre los pacientes. Similar resultado se obtuvo al comparar el número de perfiles asociados a acinos normales entre cada uno de los pacientes.

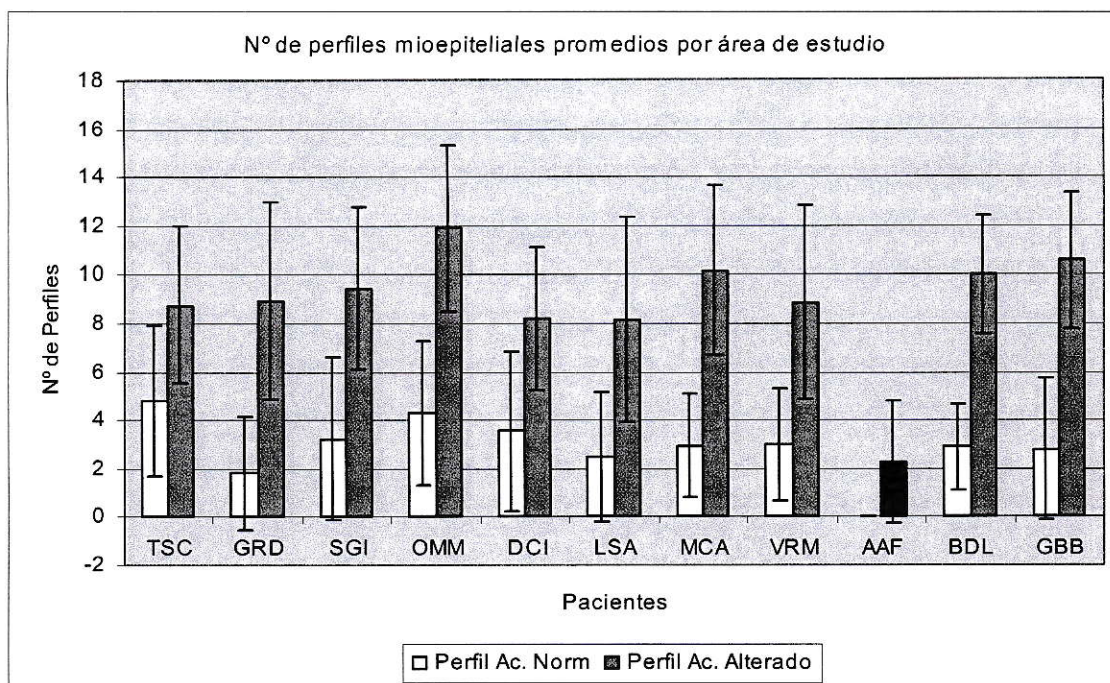


Figura 15. Número promedio de perfiles de células mioepiteliales asociadas a acinos normales y alterados por área de estudio. Las barras blancas indican el número de perfiles de células mioepiteliales asociadas a acinos normales y las grises indican el número de perfiles de células mioepiteliales asociados a acinos alterados. En negro se muestra el paciente con SS severo. Nótese que los acinos alterados poseen un mayor número de perfiles de células mioepiteliales asociadas a su superficie.

Tabla 7. Test de ANOVA para el número de perfiles de células mioepiteliales. Los resultados indican que los pacientes poseen entre si un número similar de perfiles de células mioepiteliales asociados tanto a acinos normales como alterados.

| ANOVA | Perfiles asociados a acinos alterados | Perfiles asociados a acinos normales |
|---|---------------------------------------|--------------------------------------|
| P value | 0,0597 | 0,1333 |
| ¿Son las medias significativamente diferentes? (P < 0.05) | No | No |
| Number of groups | 10 | 10 |
| F | 1,877 | 1,558 |

DISCUSIÓN

Gran parte de los estudios realizados para esclarecer los factores que desencadenan el desarrollo de la hiposecreción glandular se han enfocado en entender los mecanismos autoinmunes del SS. El modelo clásico que intenta explicar la hipofunción glandular en el SS considera que la hiposecreción es una consecuencia de la pérdida del tejido glandular debido a fenómenos autoinmunes que desencadenarían procesos apoptóticos de muerte celular, mientras que en el modelo no apoptótico de hiposecreción glandular, la atrofia glandular se explica como una consecuencia posterior a la inhibición secretora causada por el sistema inmune. (8). Estudios recientes han mostrado que parte de las alteraciones experimentadas durante el transcurso de la enfermedad desencadenan cambios estructurales (8, 15, 36), que serían responsables de la hiposecreción.

Entender cuáles son los procesos que provocan la hiposecreción glandular permitiría una mejor comprensión de la enfermedad, y en base a esto, mejorar los tratamientos clínicos. En ese sentido, este trabajo se enfocó en describir el estado del citoesqueleto de actina de las células acinares de pacientes con el SS. Algunas enfermedades están estrechamente relacionadas con anomalías en proteínas del citoesqueleto: enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cirrosis hepática, cáncer, enfermedades

de la piel y enfermedades pulmonares (39). Por otro lado, alteraciones en la estructura o localización de la actina, así como de sus proteínas asociadas, estarían directamente relacionadas con eventos patológicos e incluso letales. Además, se ha descrito que la liberación de elementos del citoesqueleto en el espacio extracelular puede contribuir al desarrollo de alergias, fibrosis cística y defectos en la coagulación (20).

Los antecedentes recopilados en este trabajo han mostrado que parte importante de los acinos presentes en una glándula salival labial poseen alteraciones en la distribución de algunas de las proteínas de su citoesqueleto, fenómeno que hemos observado con mayor frecuencia en pacientes con el SS y con Síndrome de Sicca. Esto sugiere que la hiposecreción se debería, entre otros factores, a alteraciones en el citoesqueleto que afectarían el normal funcionamiento celular. Para su correcto funcionamiento, las células epiteliales necesitan la mantención de su polaridad celular, la cual depende de componentes celulares, así como del contacto con otras células, procesos en los cuales el citoesqueleto juega un papel fundamental. Cualquier alteración en la polaridad afectará el correcto funcionamiento celular (27).

En los pacientes del grupo 1 se observó un importante número de acinos con una fina capa de actina en el límite de las células acinares, marcando su contorno, tal como se describe en la literatura (1, 52). A los acinos con esta distribución de actina les llamamos “acinos normales”. Además, se observó acinos con acumulación de actina en su región basal, acompañada de una disminución de la cantidad de actina apical. A estos acinos se les llamó “acinos

alterados”, los que también presentaron anomalías en otros componentes del citoesqueleto, tales como proteínas asociadas a actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Con estos antecedentes, pareció plausible utilizar la organización del citoesqueleto de actina como marcador para determinar el estado del citoesqueleto de las células acinares.

Utilizando la información recopilada mediante inmunofluorescencia, se realizó un recuento de los acinos, clasificándolos según el estado de organización de los microfilamentos. Los pacientes del grupo 1 poseen una proporción de acinos normales/alterados cercana a 1:1, mientras que esta proporción para los pacientes de los grupos 2 y 3 es cercana a 1:2. Estos resultados sugieren que en la glándula salival labial existiría un balance entre acinos normales y alterados, posiblemente debido a procesos de envejecimiento y recambio celular, equilibrio que en el caso de los pacientes de los grupos 2 y 3 estaría inclinado hacia una disminución de los acinos normales. Por otro lado, el número de acinos por área de estudio fue menor en los pacientes de los grupos 2 y 3, situación que es aún más notoria en los pacientes con mayor severidad de la enfermedad, indicando que el número de unidades secretoras disminuye durante el transcurso del S.S. y del Síndrome de Sicca.

Hemos observado que en los acinos normales las proteínas relacionadas a actina, tales como Arp3, Wasp y Profilina, se localizan en el citoplasma periférico, mientras que en los acinos alterados, codistribuyen con la actina acumulada en la región basal. Estos resultados sugieren que las referidas

proteínas participarían en el proceso de nucleación de la actina en la región basal de los acinos. Similares resultados se observaron con otros componentes del citoesqueleto tales como la citoqueratina 18 y la miosina II. En el caso de los microtúbulos, estos se encuentran a través de todo el citoplasma de las células de acinos normales, mientras que en las células de acinos alterados, los microtúbulos desaparecen de la región apical. Este es un cambio importante en la arquitectura celular debido al papel de los microtúbulos en la distribución de los organelos celulares, la forma celular y el desplazamiento de vesículas secretoras (1, 11, 52). Similar a lo que ocurre con la actina, la pérdida de microtúbulos desde la región apical de la célula acinar podría relacionarse con una relocalización de la maquinaria que mantiene sus propiedades. Por otro lado, la presencia de agregados de microtúbulos en la matriz extracelular, abre interrogantes sobre cómo éstos adquieren esta inusual localización. Es posible que se trate de agregados de tubulina mal plegadas que los acinos dañados son incapaces de eliminar mediante los sistemas normales de degradación de proteínas y que frente a una excesiva acumulación de éstas, serían liberadas hacia el espacio extracelular. Recientes estudios han mostrado que algunas proteínas utilizan rutas alternativas de secreción mediante un proceso llamado secreción no convencional (32). Acb1 es una proteína de levaduras que se une a la acetil coenzima A que es expresada durante eventos de esporulación desencadenados por la privación de nitrógeno. Estudios recientes han demostrado que su liberación se realiza por una vía de secreción no convencional, independiente que ocurre por autofagosomas que transportan a

Acb1 hacia la membrana plasmática para su liberación (13). En pacientes con el SS hemos visualizado la presencia de autofagosomas en las células acinares (datos no mostrados en esta tesis), que tal vez podrían estar participando en eventos de secreción no convencional.

La miosina II es un motor molecular asociado a la actividad contráctil en células musculares y no musculares (37). El citoesqueleto de las células acinares, en conjunto con la contracción de las células mioepiteliales, serían responsables de la descarga de la secreción hacia los conductos que la transportan a la cavidad oral (32). En acinos normales, la miosina II muestra una distribución uniforme en el citoplasma de las células acinares, mientras que en acinos alterados la miosina II se concentra en la región basal, codistribuyendo con la actina acumulada.

Poco se sabe sobre la participación de las células mioepiteliales en los procesos de secreción. Debido a su estrecha relación con la región basal de los acinos y al hecho que poseen una maquinaria contráctil de actina/miosina (33), nos preguntamos si parte de la actina acumulada en la región basal de los acinos alterados corresponde a un aporte de la actina perteneciente a las células mioepiteliales. Para tales efectos, estudiamos la localización de células mioepiteliales mediante inmunofluorescencia. Las células mioepiteliales poseen forma estrellada, por lo que en un mismo plano es posible ver uno o varios perfiles celulares provistos de citoqueratina 14, marcador específico de las células mioepiteliales y ductales (33). Como no es posible saber si estos perfiles pertenecen a una o varias células mioepiteliales, se realizó un recuento del

número total de perfiles asociados a acinos, con el objetivo de determinar si su localización contribuye a la señal de la actina basal en los acinos alterados. Las observaciones obtenidas sugieren que los perfiles de células mioepiteliales participan en muchos casos en la generación de una señal de actina en la región basal de los acinos, pero no serían responsables del fenómeno de actina acumulada en la región basal de acinos alterados.

La figura 16 ilustra las alteraciones que hemos observado en el citoesqueleto de las células acinares. La actina (en rojo) se redistribuye hacia la región basal, mientras que los microtúbulos (en verde) desaparecen de la región apical. La citoqueratina 18 disminuye en la zona central del citoplasma y se mantiene en la zona basolateral (en café) de las células acinares. Todos estos eventos podrían relacionarse con la hiposecreción experimentada por los pacientes que padecen SS y Síndrome de Sicca, debido a la importancia del citoesqueleto en el establecimiento y mantención de la polaridad celular, así como en los procesos de transporte y secreción (39).

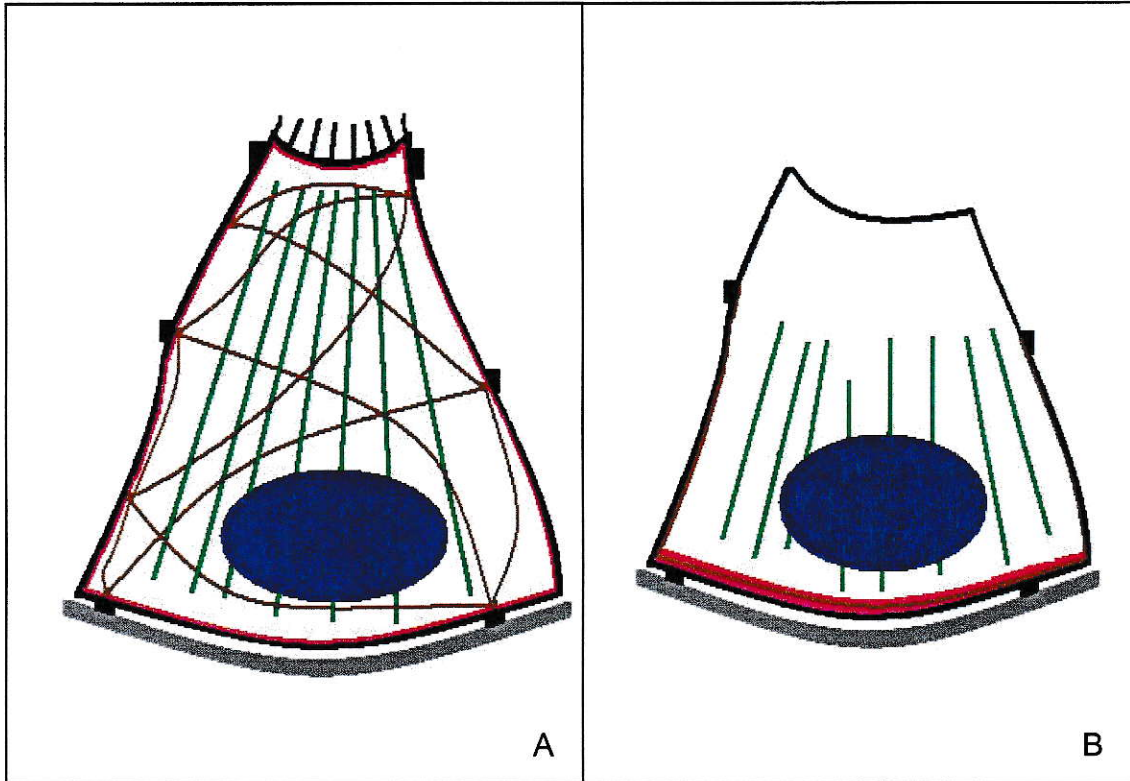


Figura 16. Representación de una célula acinar normal y alterada. La organización del citoesqueleto de una célula acinar normal está representada en la figura (A). En la célula alterada (B) la actina (en rojo) se redistribuye a la zona basal, mientras que lo microtúbulos se presentan en la región basolateral (en verde). Los filamentos de citoqueratina 18 (en café) se presentan en la región basolateral, disminuyendo en la región central del la célula. Todas estas alteraciones deben estar estrechamente relacionadas con la pérdida de la función secretora de las células acinares. Nótese la pérdida de microvellosidades de la región apical y la actina acumulada en la región basal. (Creado a partir de las observaciones realizadas en este trabajo).

CONCLUSIONES

1. Todos los pacientes estudiados presentaron acinos con y sin alteraciones de su citoesqueleto, lo cual podría ser consecuencia de una dinámica de envejecimiento y recambio celular.
2. La distribución de los filamentos de actina, junto a la integridad de los acinos, parecen ser un buen marcador del daño en las células acinares.
3. La redistribución conjunta de actina y de proteínas asociadas a su nucleación sugiere que éstas últimas podrían participar de la acumulación de la actina en la región basal de los acinos.
4. Los acinos alterados poseen un mayor número de perfiles de células mioepiteliales asociados.
5. La hiposecreción de las glándulas salivales labiales de pacientes con el SS y el S. Sicca puede ser una consecuencia de la desorganización del citoesqueleto de las células acinares.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Anaya, J.M., Ramos M., García M. (2001). Síndrome de Sjögren. Editorial Corporación para Investigaciones Biológica (CIB), Medellín, Colombia.
- 2) Anaya, J.M., Mantilla, R., Correa, P. (2005). Immunogenetics of Primary Sjögren's Syndrome in Colombians. *Semin Arth. & Rheum.* Vol. 34. pp. 735-743.
- 3) Assémat, E., Bazellières, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., Massey-Harroche, D. (2007). Polarity Complex Proteins. *Biochim. et Biophys. Acta.* Vol. 1778. pp. 614-630.
- 4) Azuma, T., Takei, M., Yoshikawa, T., Nagasugi, Y., Kato, M., Otsuka, M., Shiraiwa H., Sugano, S., Mitamura, K., Sawada, S., Masuho, Y., Seki, N. (2002). Identification of Candidate Genes for Sjögren's Syndrome Using MRL/ lpr Mouse Model of Sjögren's Syndrome and cDNA Microarray Analysis. *Immunol. Lett.* Vol. 81. pp. 171-176.
- 5) Boettner, B., Van Aelst, L. (2002). The role of Rho GTPases in disease development. *Gene.* Vol. 286. pp. 155-174.
- 6) Bradley, P.J. (2002) Microbiology and Management of Sialadenitis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* Vol. 4. pp. 217-224.
- 7) Daniels, T.E. (1984). Labial Salivary Gland Biopsy in Sjogren's Syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arth. & Rheum.* Vol. 27 (2). pp.147-156.
- 8) Dawson, L. J., Fox, P. C., Smith, P. M. (2006). Sjögren's Syndrome-the non-apoptotic model of glandular hypofunction. *Rheumathol.* Vol. 45. pp. 792-798.
- 9) Dawson, L. J., Smith, P. M., Moots, R. J., Field, E. A. (2000). Sjögren's Syndrome-time for a new approach. *Rheumathol.* Vol. 39 (3). pp. 234-237.
- 10) Deborde, S., Perret, E., Gravotta, D., Deora, A., Salvarezza, S., Schreiner, R., Rodríguez-Boulan, E. (2008). Clathrin is a Key Regulator of Basolateral Polarity. *Nature.* Vol. 452. pp. 719- 725.
- 11) Desai, A., Mitchison, T.J. (1997) Microtubule Polymerization Dynamics. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* Vol. 13. pp. 83-117.

- 12) Dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Desova, I. V., Tsubakihara, M., Berry D.A., Nosworthy N.J. (2003). Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiol. Rev.* Vol. 83 (2). pp. 433-473.
- 13) Duran, M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W., Malhotra, V. (2010). Unconventional Secretion of Acb1 is Mediated by Autophagosomes. *Jour. Cell Biol.* Vol. 188 (4). pp. 527-536.
- 14) Fox, R. I., Kang, H.I., Ando, D., Abrams, J., Pisa, E. (1994). Cytokine mRNA Expression in Salivary Gland Biopsies of Sjögren's Syndrome. *J. Immunol.* Vol. 152. pp. 5532-5539.
- 15) Goicovich, E., Molina, C., Pérez, P., Aguilera, S., Fernández, J., Olea, N., Alliende, C., Leyton, C., Romo, R., Leyton, L., Gonzáles, M.J. (2003). Enhanced Degradation of Proteins of the Basal Lamina and Stroma by Matrix Metalloproteinase From the Salivary Glands of Sjögren's Syndrome Patients. *Arth. & Rheum.* Vol. 48 (9). pp. 2573-2584.
- 16) Guirado., O. Solanas, M., Costa, I., Escrich E. (2002). El Citoesqueleto de Actina: Una Perspectiva Desde la Biología Molecular del Cáncer. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* Vol. 21 (2). pp. 115-122.
- 17) Hartsock, A., Nelson, W.J. (2008). Adherents and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim. et Biophys. Act.* Vol. 1778. pp. 660-669.
- 18) Hjelmervik, T.O., Petersen, K., Jonassen, I., Jonsson, R., Bolstad, A.I. (2005). Gene Expression Profiling of Minor Salivary Glands Clearly Distinguishes Primary Sjögren's Syndrome Patients From Healthy Control Subjects. *Arth. & Rheum.* Vol. 52 (5). pp. 1534-1544.
- 19) Higgs, H., Pollard, T. (2001). Regulation of Actin Filament Network Formation Through ARP2/3 Complex: Activation by a Diverse Array of Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* Vol. 70. pp. 649-676.
- 20) Janmey, P.A., Chaponnier, C. (1995). Medical Aspects of the Actin Cytoskeleton. *Curr. Opi. in Cell Biol.* Vol. 7. pp. 111-117.
- 21) Jonsson, R., Haga, H.J., Gordon, T.P. (2000). Current Concepts on Diagnosis, Autoantibodies and Therapy in Sjögren's Syndrome. *Scand. J. Rheumatol.* Vol. 29. pp. 341-348.

- 22) Jonsson, R., Gordon, T., Konttinen, Y. (2003). Recent Advances in Understanding Molecular Mechanism in the Pathogenesis and Antibody Profile of Sjögren's Syndrome. *Cur. Rheumatol. Rep.* Vol. 5. pp. 311-316.
- 23) Kapsogeorgou, E.K., Dimitriou, L.D., Abu-Helu, R.F., Moutsopoulos, H.M., Manoussakis, M.N. (2001) Activation of Epithelial and Myoepithelial Cells in the Salivary Glands of Patients with Sjögren's Syndrome: High Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM.1) in Biopsy Specimens and Culture Cells. *Clin. Exp. Immunol.* Vol. 124. pp. 126-133.
- 24) Klionsky, D. J. (2007). Autophagy: from Phenomenology to Molecular Understanding in Less Than a Decade. *Nature. Rev. Mol. Cell Biol.* Vol. 8. pp. 931- 937.
- 25) Konttinen, Y.T., Porola, P., Konttinen, L., Laine, M., Poduval, P. (2006). Immunohistopathology of Sjögren's syndrome. *Autoim. Rev.* Vol. 6. pp. 16-20.
- 26) Lanzetti, L. (2007). Actin in Membrane Trafficking. *Curr. Opin. In Cell Biol.* Vol. 19. pp. 453-458.
- 27) Leiser, J., Molitoris, B. (1993). Disease Processes in Epithelia: the Role of the Actin Cytoskeleton and Altered Surface Membrane Polarity. *Bioch. et Biophys. Acta.* Vol. 1225. pp. 1-13.
- 28) Magin, T., Vijayaraj, P., Leube, R. (2007). Structural and Regulatory Functions of Keratins. *Exp. Cell Res.* Vol. 313. pp. 2021-2031.
- 29) Manganelli, P. Fietta, P. (2003). Apoptosis and Sjögren Syndrome. *Sem. In Arthri. & Reum.* Vol. 33 (1). pp. 49-65.
- 30) Miyoshi, J., Takai, Y. (2005). Molecular Perspective on Tight-junction Assembly and Epithelial Polarity. *Advan. Drug Deliv. Rev.* Vol. 57. pp. 815- 855.
- 31) Moutsopoulos, H.M. (1994). Sjögren Syndrome: Autoimmune Epithelitis. *Clin. Immunol. & Immunopath.* Vol. 72 (2). pp. 162-165.
- 32) Nickel, W., Rabouille, C. (2009). Mechanisms of Regulated Unconventional Protein Secretion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Vol. 10. pp. 148–155.
- 33) Ogawa, Y. (2003). Immunocytochemistry of Myoepithelial Cells in the Salivary Glands. *Progr. Histochem. Cytochem.* Vol. 38 (4). pp. 343-426.

- 34) Ohlsson, M., Skarteins, K., Bolstad, Al., Johannessen, AC., Jonsson, R. (2001). Fas-induced Apoptosis is a Rare Event in Sjögren`s Syndrome. *Lab. Invest.* Vol. 81. pp. 95-105.
- 35) Orsini, S., Linhares K., Mota, A., Nunes, J., Cavalcanti, V. (2008). Immunoprofile of Kuttner Tumor (Chronic Sclerosing Sialadenitis). *Int. Jour. Surg. Patho.* Vol. 16 (2). pp. 143-149.
- 36) Pérez, P., Goicovich, E., Alliende, C., Aguilera, S., Leyton, C., Molina, C., Pinto, R., Romo, R., Martínez, B., Gonzáles, M. J. (2000). Differential Expression of Matrix Metalloproteinases in Labial Salivary Glands of Patients with Primary Sjögren`s Syndrome. *Arth. & Rheum.* Vol. 43. pp. 2807- 2817.
- 37) Pollard T. D., Blanchoin, L., Mullins, R. D. (2000). Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* Vol. 29. pp. 545-576.
- 38) Ramos-Casals, M., Fony, J. (1968). Primary Sjögren`s Syndrome: Current and Emergent Aetiopathogenic Concepts. *Rheumatol.* Vol. 44. pp. 1354-1367.
- 39) Ramaekers, F., Bosman, T. (2004). The Cytoskeleton and Disease. *Journ. Pathol.* Vol. 204. pp. 351-354.
- 40) Rhodus, N. L. (1997). Oral Pilocarpine HCl Stimulates Labial (minor) Salivary Gland Flow in Patients with Sjögren`s Syndrome. *Oral Dis.* Vol. 3. pp. 93-98.
- 41) Rollason, R., Korolchuck, V., Hamilton, C., Jepson, M., Banting, G. (2009). A CD317/tetherin-RICH2 Complex Plays a Critical Role in the Organization of the Subapical Actin Cytoskeleton in Polarized Epithelial Cells. *Journ. Cell. Biol.* Vol. 184 (5). pp. 721-736.
- 42) Slayter, E. (1992). *Light and Electron Microscopy.* Cambridge University Press. New York. USA.
- 43) Stein, M.P., Wandinger-Ness, A., Roitbak, T. (2002). Altered trafficking and epithelial cell polarity in disease. *Tr. in Cell Biol.* Vol.12 (8). pp. 374-381.
- 44) Tandler, B., Denning, C., Mandel, I., Kutscher, A. (1969). Ultrastructure of Human Labial Salivary Glands. *Journ. Morph.* Vol. 127. pp. 383-408.

- 45) Talal, N., Moutsopoulos, S., Kassan, S. (1987). Sjögren's Syndrome, Clinical and Immunological Aspects. Springer-Verlag, Alemania.
- 46) Tanos, B., Rodriguez-Boulan, E. (2008). The Epithelial Polarity Program: Machineries Involved and their Hijacking by Cancer. *Oncog.* Vol. 27. pp. 6939-6957.
- 47) Hayashi, T., Hayashi, H., Fujii, T., Adachi, C., Hasegawa, K. (2008). Ultrastructure of Myoepithelial Cells as a Target Cell in Sialoadenitis of Submandibular Glands of Lupus-prone Female NZBxNZWF1 Mice. *Virch. Arch.* Vol. 453. pp. 177-188.
- 48) Triantafyllidou, A., Moutsopoulos, H.M. (2007). Persistent Viral Infection in Primary Sjögren's Syndrome: Review and Perspectives. *Clin. Rev. Allerg. Immunol.* Vol. 32. pp. 210-214.
- 49) Tzioufas, A.G., Voulgarelis, M. (2007). Update on Sjögren's Syndrome Autoimmune Epithelitis: from Classification to Increased Neoplasias. *Best Prac. & Res. Clin. Rheumatol.* Vol. 21 (6). pp. 989-1010.
- 50) Venables, P. (2004). Sjögren's Syndrome. *Best Prac. & Res. Clin. Rheumatol.* Vol. 18 (3). pp. 313-329.
- 51) Vitali, C., Bombardieri, S., Jonsson, R., Moutsopoulos, H.M., Alexander, E.L., Carsons, S.E., Daniels, T.E., Fox, P.C., Kassan, S.S., Pillemer, S.r., Talal, N., Weisman, M.H. (2002) Classification Criteria for Sjögren's Syndrome: a Revisited Version of the European Criteria Proposed by the American-European Consensus Group. *Ann. Rheum. Dis.* Vol. 61. pp. 554-558.
- 52) Wu, K., Jerdeva, G. V., da Costa, S. R., Sou, E., Schechter, J. E., Hamm-Alvarez, S. F. (2006). Molecular Mechanisms of Lacrimal Acinar Secretory Vesicle Exocytosis. *Exp. Eye Res.* Vol. 83. pp. 84-96.
- 53) Yamamoto, K. (2002) Patogénesis of Sjögren's Syndrome. *Autoim. Rev.* Vol. 2. pp. 13-18.
- 54) Artículo *online* "Glándulas salivales", de la Dra. Lorena Patiño R. (2005). http://www.freewebs.com/canal9/GLANDULAS_SALIVALES.ppt
- 55) Artículo *online* "Citoesqueleto". <http://www.maph49.galeon.com/celula/cytoreview.html>

Apéndice: Soluciones utilizadas para Inmunofluorescencia

1) PBS 10X

| | |
|--|---------|
| NaCl | 8 grs |
| KCl | 0,2gr |
| Na ₂ HPO ₄ x12H ₂ O | 2,61gr |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 grs |

Disolver en 100 mL H₂O destilada, ajustar pH a 7,4 y filtrar antes de usar.

2) Solución de permeabilización

Tritón X-100 (Sigma) al 0,2% preparado en PBS 1X

3) Solución de Bloqueo

BSA (albúmina de suero bovino) al 3%, preparada en PBS 1X y suplementada con azida de sodio al 0,2% y Tritón X-100 al 0,1%.

4) Medio de Montaje

Glicerol y PBS 1X en una proporción de 9:1 respectivamente.